

RIBOSOMEN UND RIBONUCLEINSÄUREN DER GRÜNALGE DUNALIELLA

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

HANS JOBST RAHMSDORF

aus Berlin

Berlin 1970

1971

RIBOSOMEN UND RIBONUCLEINSÄUREN DER GRÜNALGE DUNALIELLA

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

von

HANS JOBST RAHMSDORF

aus Berlin

Berlin 1970



1. Gutachter: Herr Professor Dr. H. G. Schweiger

2. Gutachter: Herr Professor Dr. J. Reinert

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1971

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Wilhelmshaven in der Abteilung Schweiger durchgeführt.

Herrn Professor Reinert danke ich für sein fortgesetztes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Dillard bin ich für die Einführung in die Methodik und Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor Schweiger für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein andauerndes Interesse und fruchtbare Diskussionen während der Durchführung der Versuche.

Die Durchführung der Experimente wurde durch eine finanzielle Unterstützung der Max-Planck-Gesellschaft ermöglicht.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
1. Vorkommen von Ribosomen	1
a) In Organismen	1
b) In Zellorganellen	1
2. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften der Ribosomen	2
a) Allgemeine Charakterisierung	2
b) Ribosomenklassen	3
c) Physikalische Eigenschaften der Ribosomen	3
Größe, elektronenoptische Untersuchungen	3
Sedimentationskoeffizienten	3
d) Dissoziationsverhalten der Ribosomen	4
70 s Ribosomen	4
80 s Ribosomen	5
e) Chemische Zusammensetzung der Ribosomen	7
Ribosomale Ribonucleinsäuren (RNS)	7
Ribosomale Proteine	9
f) Abweichendes Verhalten von Ribosomen	10
3. Problemstellung	11
 MATERIAL UND METHODEN	 12
1. Zellmaterial	12
2. Zellkultur	12
3. Zellwachstum	16
4. Ribosomen	18
a) Präparation	18
b) Saccharosedichtegradientenzentrifugation	20
Lineare Gradienten	20
Exponentielle Gradienten	20
Berechnung der exponentiellen Gradienten	21

Herstellung der exponentiellen Gradienten	24
Prüfung der exponentiellen Gradienten	27
c) Zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge	27
5. Ribonucleinsäuren	28
a) Präparation	28
RNS aus ganzen Zellen von Dunaliella	28
RNS aus Ribosomen von Dunaliella	29
RNS aus E. coli	29
b) Zentrifugation im exponentiellen Gradienten	31
c) Zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge	32
ERGEBNISSE	33
A. Ribosomen aus Dunaliella-Zellen	33
1. Absorptionsspektrum der Ribosomenpräparate	33
2. Ribosomenklassen aus Dunaliella und ihre Sedimentationskoeffizienten	33
3. Stabilität der Ribosomenpräparate	41
4. Isolierung der Ribosomenklassen und Rezentrifugation im exponentiellen Gradienten	41
5. 80 s Ribosomen von Dunaliella bei Mg^{2+} -Konzentrationen unter 10^{-2} M	43
6. Ribosomen aus Dunaliella bei Mg^{2+} -Konzentrationen über 10^{-2} M	46
B. Ribonucleinsäuren aus Dunaliella-Zellen	53
1. RNS aus ganzen Zellen von Dunaliella	53
a) Absorptionsspektrum der RNS	53
b) Sedimentationskoeffizienten und Sedimentationsprofil der RNS	53
c) Einfluß von Nucleasen	56
d) Mengenverhältnisse der RNS-Komponenten	59
e) Isolierung und Rezentrifugation der RNS-Komponenten	59
f) Endogene Degradation der RNS	61
2. RNS aus Ribosomen von Dunaliella	63
a) RNS aus Gesamt-Ribosomen	63
RNS aus "TMK-Ribosomen"	63
RNS aus "TMKMP-Ribosomen"	63

b) RNS aus den Ribosomenklassen	66
RNS aus 80 s Ribosomen	66
RNS aus 50 s Ribosomen	66
RNS aus Ribosomenaggregaten	66
 DISKUSSION	 68
1. Das Pflanzenmaterial	68
2. Saccharosedichtegradientenzentrifugation	69
3. Monosomen aus Dunaliella	70
a) 80 s Ribosomen	70
b) 70 s Ribosomen	71
c) Die Monosomen aus Dunaliella bei unterschiedlichen K^+/Mg^{2+} -Quotienten	72
4. Untereinheiten der Dunaliella-Ribosomen	74
a) Die Dissoziation der 80 s Ribosomen und die dabei entstehenden Partikel	74
Die schwere Untereinheit	75
Die leichte Untereinheit	76
b) Die Dissoziationsprodukte der 70 s Ribosomen	76
Die schwere Untereinheit	76
Die leichte Untereinheit	77
5. Ribonucleinsäuren aus Dunaliella	78
a) Vergleich der RNS aus ganzen Zellen und aus Ribosomen und die chemische Integrität der Ribosomen	78
b) Die schweren ribosomalen Ribonucleinsäuren	79
c) Die leichten ribosomalen Ribonucleinsäuren	81
6. Schlußfolgerungen	85
 ZUSAMMENFASSUNG	 90
 LITERATURVERZEICHNIS	 92



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548809_0024

EINLEITUNG

Der Mechanismus der Proteinsynthese besteht aus einer Reihe von Einzelreaktionen, bei denen den Ribosomen eine besondere Bedeutung zukommt. An ihnen findet die peptidartige Verknüpfung der Aminosäuren statt (Jacob u. Monod 1961; Watson 1963).

1. Vorkommen von Ribosomen

In den letzten 15 Jahren ist über die chemische Zusammensetzung und die Struktur der Ribosomen intensiv gearbeitet worden. Im Laufe dieser Untersuchungen hat sich gezeigt, daß Ribosomen ubiquitär verbreitete Zellorganellen sind, die in allen lebenden Systemen nachgewiesen werden können.

a) In Organismen

Bei den Bakterien wurden die Ribosomen von *Escherichia coli* am eingehendsten untersucht (Lit.: Traub 1970). Bei höheren Organismen wurden Ribosomen in sämtlichen geprüften Zellen, Organen und Geweben nachgewiesen (Lit.: Petermann 1964, Spirin u. Gavrilova 1969). Unter den Algen wurden neben *Euglena* (Rawson u. Stutz 1968, 1969) und *Fucus* (Linskens 1969) vor allem die Grünalgen bearbeitet (Galling 1968, 1970; Hooper u. Blobel 1969; Janowski et al. 1969; Sager u. Hamilton 1967).

b) In Zellorganellen

In grünen Pflanzen konnten im Unterschied zu nicht grünen pflanzlichen Geweben zwei Ribosomen-typen nachgewiesen werden, die sich u. a. in ihren Sedimentationskoeffizienten unterscheiden. Lyttleton hat gezeigt, daß eine der beiden Komponenten aus den Chloroplasten der Pflanzen

stammt (Lyttleton 1962). Sein Objekt, Spinatchchloroplasten, war in der folgenden Zeit das wichtigste für Untersuchungen über Chloroplastenribosomen (Biswas u. Biswas 1965; Gualerzi u. Cammarano 1969a, b; Spencer 1965). Daneben wurde die Isolierung von Ribosomen aus den Chloroplasten einer großen Zahl anderer höherer und niederer Pflanzen beschrieben (Boardman et al. 1966; Chen u. Wildman 1970; Hadziyev u. Zalik 1970; Hooper u. Blobel 1969; Janowski et al. 1969; Odintsova et al. 1967; Rawson u. Stutz 1969; Ruppel 1968; Sager u. Hamilton 1967; Svetailo et al. 1967).

Auch in anderen Zellorganellen sind Ribosomen nachgewiesen worden. Pogo hat z. B. über die Isolierung und Reinigung von Ribosomen aus den Kernen von Thymuszellen berichtet (Pogo et al. 1962). Der Nachweis von Ribosomen in Mitochondrien wurde u. a. an *Xenopus laevis* (Swanson u. Dawid 1970), *Saccharomyces cerevisiae* (Stegeman et al. 1970), *Neurospora crassa* (Küntzel 1969; Küntzel u. Noll 1967) und an Rattenlebern (O'Brien u. Kalf 1967) erbracht (Lit.: Küntzel 1970).

2. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften der Ribosomen

a) Allgemeine Charakterisierung

Ribosomen sind korpuskuläre Nucleoproteide mit Molekulargewichten zwischen 2,7 und 4,5 Millionen, die 40-65 % Ribonucleinsäure enthalten. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, die schwere Untereinheit nimmt etwa zwei Drittel der Masse des Ribosoms ein. Jede Untereinheit stellt ein hochmolekulares Ribonucleinsäuremolekül, das mit 20 - 100 Polypeptidketten verbunden ist, dar. Entzieht man Ribosomen einen Teil ihres Magnesium-Gehalts, dann zerfallen sie reversibel in ihre Untereinheiten. Als Microsomen bezeichnet man eine Zellfraktion, die Teile des endoplasmatischen Reticulums der Zelle mit daran gebundenen Ribosomen enthält.

b) Ribosomenklassen

Trotz des prinzipiell ähnlichen Aufbaus der Ribosomen aus allen Organismengruppen hat sich gezeigt, daß man mindestens zwei Klassen von Ribosomen unterscheiden muß. Sie differieren in ihrer Größe, in ihrer Stabilität gegenüber Magnesium-Entzug, in den Molekulargewichten ihrer Ribonucleinsäuren, in ihrem Proteinhmuster und in ihrer Hemmbarkeit durch Antibiotika. Die eine Ribosomenklasse findet man bei Bakterien, Blaualgen, Chloroplasten und Mitochondrien, die andere im Grundplasma von Eukaryonten.

In den folgenden Abschnitten soll auf die Eigenschaften dieser Ribosomenklassen näher eingegangen werden.

c) Physikalische Eigenschaften der Ribosomen

Größe, elektronenoptische Untersuchungen

Im Elektronenmikroskop sehen Ribosomen rund und kompakt aus. Bakterienribosomen haben im trockenen Zustand eine Größe von etwa $200 \times 170 \text{ \AA}$ und lassen eine Einschnürung zwischen den Untereinheiten erkennen (Hall u. Slayter 1959). Die für die Eukaryonten typischen Ribosomen zeigen dagegen im elektronenoptischen Bild die beiden Untereinheiten nicht. Sie sind $260 - 300 \times 190 - 220 \text{ \AA}$ groß (Bruskov u. Odintsova 1968; Odintsova et al. 1967; Shelton u. Kuff 1966).

Sedimentationskoeffizienten

Die Ribosomen aus Prokaryonten, Chloroplasten und Mitochondrien sedimentieren mit einem Sedimentationskoeffizienten von rund 70 s, während die für Eukaryonten typischen Ribosomen mit etwa 80 s sedimentieren. Entsprechend diesen Werten sind die beiden Ribosomenklassen als "70 s" und "80 s" Ribosomen bezeichnet worden. Daß es

sich tatsächlich um zwei unterschiedliche Ribosomenpopulationen handelt, die keine Übergänge zeigen, hat Taylor in einer statistischen Arbeit gezeigt, in der er 25 Bakterien-, 2 Blaualgen- und 26 Pilzarten miteinander verglich (Taylor u. Storck 1964). Ferner haben sämtliche durchgeführten Untersuchungen bestätigt, daß die Ribosomen aus Mitochondrien und Chloroplasten leichter als diejenigen aus dem Grundplasma sind und zum Typ der 70 s Ribosomen gehören. Wie oben erwähnt, sind also in den Zellen von Eukaryonten zwei Ribosomenklassen vorhanden (Svetailo et al. 1967).

d) Dissoziationsverhalten der Ribosomen

Normalerweise enthalten 70 s Ribosomen etwa 2500 Magnesium-Atome pro Ribosom, 80 s Ribosomen ungefähr 4000 (Choi u. Carr 1967; Goldberg 1966; Petermann 1960). Entzieht man Magnesium, so daß der Gehalt 1000 - 2000 Atome pro Ribosom unterschreitet, dann dissoziieren sie. Bei weiterer Entfernung des Magnesiums kommt es zu einem Zusammenbruch der kompakten Struktur der Untereinheiten. 70 und 80 s Ribosomen unterscheiden sich in dem Magnesium-Bedarf, den sie für ihre strukturelle Integrität benötigen, in ihrem Dissoziationsverhalten und in der Größe ihrer Untereinheiten.

70 s Ribosomen

70 s Ribosomen von Bakterien zerfallen bei Magnesium-Konzentrationen unter 10^{-3} M in die beiden Untereinheiten, die mit 50 und 30 s sedimentieren (Oppenheim et al. 1968; Tissières et al. 1959).

Ähnlich verhalten sich Mitochondrien- und Chloroplastenribosomen höherer Pflanzen. Die leichtere Untereinheit dieser Ribosomen sedimentiert jedoch häufig etwas schneller als die entsprechenden Partikel von Bakterien (Boardman et al. 1966; Küntzel 1969).

Sehr viel empfindlicher gegen Magnesium-Entzug sind die Ribosomen aus Algenchloroplasten. Sie zerfallen bei Magnesium-Konzentrationen, bei denen die 70 s Ribosomen aus Bakterien oder aus Chloroplasten höherer Pflanzen noch undissoziiert sind. So sind bei *Chlorella* bisher keine Chloroplastenribosomen nachgewiesen worden (Galling 1968). Sager konnte aus Chloroplasten von *Chlamydomonas* keine intakten Ribosomen isolieren. Ihre Befunde deuteten darauf hin, daß die Stabilität der Ribosomen vom K^+/Mg^{2+} -Quotienten im Isolierungspuffer abhängt. Bei Quotienten über 8:1 werden die Ribosomen instabil (Hoover u. Blobel 1969; Sager u. Hamilton 1967). Auch bei *Acetabularia* und *Euglena* wurde gezeigt, daß bereits bei einer Magnesium-Konzentration von 10^{-2} M ein großer Anteil der Chloroplastenribosomen in Form der Untereinheiten vorliegt (Janowski et al. 1969; Kloppstech unveröff.; Rawson u. Stutz 1969).

80 s Ribosomen

Um 80 s Ribosomen in ihre Untereinheiten zu zerlegen, muß ihnen das Magnesium stärker entzogen werden, als das bei 70 s Ribosomen der Fall ist. Eine Dialyse der Ribosomen gegen Magnesium-arme oder Magnesium-freie Puffer reicht meist nicht aus. Im allgemeinen werden Magnesium bindende Reagenzien wie Äthylendiamintetraacetat (EDTA) oder Pyrophosphat verwendet.

Die Dissoziation der 80 s Ribosomen aus tierischen Geweben hängt von der Methode ab, mit der das Magnesium den Ribosomen entzogen wird. Leberribosomen dissoziieren in Gegenwart von KCl bei geringen EDTA-Konzentrationen in eine 60 s und eine 50 s Komponente. Bei höheren EDTA-Konzentrationen oder in Abwesenheit von KCl entstehen 47 s und 32 s Partikel. Aus der Abhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten dieser Partikel von der EDTA-Konzentration wurden für die

Sedimentationskoeffizienten der Untereinheiten im undissoziierten Ribosom Werte von 57 s und 36 s berechnet (Tashiro u. Yphantis 1965). Ähnliche Werte sind von anderen Autoren für Ribosomen aus Leber (Henshaw 1964), Jensen Sarcoma (Petermann u. Pavlovic 1966), Muskelgewebe (Martin et al. 1969) und Reticulocyten (Gould et al. 1966; Lamfrom u. Glowacki 1962) gefunden worden.

In den letzten Jahren wurde eine Methode entwickelt, tierische 80 s Ribosomen mit KCl-Konzentrationen über 0,2 M in die Untereinheiten zu zerlegen. Es entstehen dabei 60 s und 40 s Partikel, die sich, im Unterschied zu den nach EDTA-Behandlung erhaltenen Teilchen, wieder zu aktiven Monosomen reassoziieren lassen (Bonanou et al. 1968; Martin et al. 1969; Nolan u. Arnstein 1969; Terao u. Ogata 1970).

Ähnliche Verhältnisse wie bei tierischem Material findet man bei Pilzen und höheren Pflanzen. In diesen Organismen sind die 80 s Ribosomen bei Magnesium-Konzentrationen, bei denen die 70 s Ribosomen aus den Mitochondrien und Chloroplasten der gleichen Art in ihre Untereinheiten zerfallen sind, stabil. Bei der Dissoziation der Ribosomen durch Dialyse gegen Magnesium-freien Puffer, durch EDTA oder durch Pyrophosphat entstehen zwei Untereinheiten, die mit 60 und 40 s sedimentieren (Biswas 1969; Boardman et al. 1966; Chao 1957; Hersh u. Phillips 1964; Hsiao 1964; Küntzel 1969; Ts'o et al. 1956, 1958). Bei stärkerem Magnesium-Entzug entstehen Partikel mit geringeren Sedimentationskoeffizienten (Ghosh 1969; Morgan 1962; Ts'o et al. 1958).

Die 80 s Ribosomen aus dem unstrukturierten Cytoplasma von Algen und Protisten sind gegen Magnesium-Entzug z. T. recht stabil und unterscheiden sich nicht von den 80 s Ribosomen anderer Eukaryonten (Galling 1968; Leick u. Plesner 1968; Rawson u. Stutz 1968). Eine

gewisse Ausnahme scheinen die 80 s Ribosomen aus der Grünalge *Chlamydomonas* (Hoover u. Blobel 1969; Sager u. Hamilton 1967) und aus dem trypanosoma-artigen Flagellaten *Crithidia* (Cross 1970) zu bilden, die schon bei relativ hohen Magnesium-Konzentrationen in die Untereinheiten zerfallen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß 70 s Ribosomen bei höheren Magnesium-Konzentrationen dissoziieren als 80 s Ribosomen. Unterschiedlich verhalten sich die Chloroplastenribosomen einiger Algen, die selbst bei Magnesium-Konzentrationen über 10^{-2} M instabil sind, und die 80 s Ribosomen von *Chlamydomonas* und *Crithidia*.

2) Chemische Zusammensetzung der Ribosomen

70 s Ribosomen enthalten etwa 60 - 65 % Ribonucleinsäure und 40 - 35 % Protein. Ihre Dichte in CsCl beträgt ungefähr 1,61 - 1,64 g/ccm (Meselson et al. 1964). Aus der Größe der Ribosomen auf elektronenmikroskopischen Bildern und ihrer Dichte errechnen sich Werte für ihre Molekulargewichte (Huxley u. Zubay 1960), die gut mit dem von Tissières angegebenen Wert von $2,8 \times 10^6$ Daltons übereinstimmen (Tissières et al. 1959).

80 s Ribosomen enthalten sowohl absolut als auch relativ mehr Protein als 70 s Ribosomen. Das Ribonucleinsäure/Protein-Verhältnis gründlich gereinigter 80 s Ribosomen ist etwa gleich 1. Dies entspricht einer Dichte in CsCl von etwa 1,55 g/ccm (Perry u. Kelley 1966).

Ribosomale Ribonucleinsäuren (RNS)

Aus 70 s Ribosomen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien lassen sich zwei hochmolekulare RNS-Klassen isolieren, eine 23 s RNS, die aus der 50 s Untereinheit stammt, und eine 16 s RNS aus der

30 s Untereinheit. Aus tierischen 80 s Ribosomen kann man ebenfalls zwei RNS-Klassen gewinnen, die mit 28 und 18 s sedimentieren. 28 s, 23 s, 18 s und 16 s RNS haben Molekulargewichte von 1,75, 1,07, 0,70 und $0,56 \times 10^6$ Daltons (Kurland 1960; Loening 1968; Stanley u. Bock 1965).

Die schwere RNS aus den 80 s Ribosomen von Pilzen und höheren Pflanzen sedimentiert dagegen mit etwa 25 s. Die Größe der leichten pflanzlichen RNS aus 80 s Ribosomen wird noch diskutiert. Während in der analytischen Ultrazentrifuge gezeigt wurde, daß die leichte RNS aus Pilzen etwas schneller als diejenige aus Bakterien sedimentiert (Taylor et al. 1967), erbrachten Untersuchungen mit Hilfe linearer oder exponentieller Saccharosegradienten keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden RNS-Klassen (Click u. Tint 1967; Küntzel u. Noll 1967; Stutz u. Noll 1967).

Loening hat die RNS aus grünen pflanzlichen Geweben elektrophoretisch untersucht (Loening u. Ingle 1967). Die Elektrophorese trennt die RNS-Klassen nach ihren Molekulargewichten, aus denen Rückschlüsse auf die Sedimentationskoeffizienten gezogen werden können (Bishop et al. 1967). Mit der Elektrophorese konnten im Unterschied zur Saccharosegradientenzentrifugation aus grünen pflanzlichen Geweben vier RNS-Klassen nachgewiesen werden, die 25 s, 23 s, 18 s und 16 s-Komponenten entsprechen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die 25 und 18 s RNS aus dem unstrukturierten Cytoplasma und die 23 und 16 s RNS aus den Chloroplasten der Pflanzen stammt.

Bisher sind nur wenige Algen im Hinblick auf ihre ribosomale RNS untersucht worden. Die Verhältnisse scheinen denjenigen bei höheren Pflanzen zu ähneln. Aus dem Grundplasma läßt sich eine 25 und eine 18 s RNS isolieren, während die Chloroplasten eine 23 und eine 16 s RNS enthalten (Hoover u. Blobel 1969; Loening 1968; Schweiger 1970). Sager hat

allerdings für die RNS aus 80 s Ribosomen aus Chlamydomonas Werte von 24 s und 16 s angegeben (Sager u. Hamilton 1967). Bei Euglena betragen die entsprechenden Werte 24 s und 20 s (Rawson u. Stutz 1968).

Ribosomale Proteine

Sedimentationsanalysen der ribosomalen Proteine haben ergeben, daß ihr mittleres Molekulargewicht zwischen 12000 und 16000 Daltons liegt. Während die 30 s Untereinheit von Escherichia coli-Ribosomen 21 Proteine enthält, wird die Zahl der Proteine in der schweren Untereinheit von 80 s Ribosomen auf etwa 100 geschätzt (Hamilton u. Ruth 1967; Mathias u. Williamson 1964; Moore et al. 1968).

Über die Ausstattung einer ribosomalen Untereinheit mit Proteinen lassen sich folgende Aussagen machen:

- (1) Die ribosomalen Proteine sind unterschiedlich groß. Ihre Molekulargewichte liegen zwischen rund 10000 und 25000 Daltons.
- (2) Alle Peptidketten eines Partikels sind chemisch voneinander verschieden.
- (3) Die Untereinheiten besitzen eine einheitliche Ausstattung mit ribosomalen Proteinen (Moore et al. 1968).

Dagegen unterscheiden sich sowohl die Proteinmuster der schweren und leichten ribosomalen Untereinheit als auch diejenigen von 70 und 80 s Ribosomen. Die ribosomalen Proteine aus unterschiedlichen Geweben einer oder nah verwandter Gattungen können dagegen sehr ähnlich oder identisch sein (Low u. Wool 1967).

Eine Reihe von Arbeiten an grünen Pflanzen hat gezeigt, daß sich die Proteine von 80 s Ribosomen aus dem Grundplasma und von 70 s Ribosomen aus den Chloroplasten voneinander unterscheiden. In einigen Fällen wurden aber Ähnlichkeiten im Proteinmuster von Chloroplasten- und Escherichia coli-Ribosomen gefunden (Biswas et al. 1969; Gualerzi u. Cammarano 1969a, 1970; Janda u. Wittmann 1968; Lyttleton 1968).

f) Abweichendes Verhalten von Ribosomen

Es ist, wie oben gezeigt, möglich, Ribosomen in Klassen zu unterteilen und die Ribosomen einer Klasse durch ihre Größe, ihr Dissoziationsverhalten und die Molekulargewichte ihrer ribosomalen Ribonucleinsäuren zu charakterisieren. Die Ribosomen einer Reihe evolutionär alter Organismen, wie z. B. pflanzlicher Flagellaten, Grünalgen und Protozoen, lassen sich jedoch nicht zwanglos in diese Klassen einordnen:

(1) Ihre Chloroplastenribosomen zerfallen unter Bedingungen, unter denen diejenigen höherer Pflanzen in Form der Monosomen vorliegen.

(2) Die 80 s Ribosomen einiger dieser Organismen dissoziieren bei relativ hohen Magnesium-Konzentrationen und ähneln in dieser Eigenschaft den 70 s Ribosomen von Bakterien.

(3) Man findet Ribosomen und Ribonucleinsäuren mit ungewöhnlichem Sedimentationsverhalten.

(4) Die Basenzusammensetzung der ribosomalen Ribonucleinsäuren kann von der Norm abweichen (Lit.: Spirin 1969).

Die Bedeutung dieser Abweichungen läßt sich jedoch nur schwer beurteilen, da nur eine geringe Artenzahl aus diesen Organismengruppen untersucht wurde und die Angaben z. T. widersprüchlich sind. So kam man bei der Untersuchung der Ribosomen und der ribosomalen Ribonucleinsäuren von *Chlamydomonas* zu unterschiedlichen Ergebnissen (Hoover u. Blobel 1969; Sager u. Hamilton 1967). Während Sager bei der Dissoziation der 80 s Ribosomen dieses Flagellaten drei Untereinheiten feststellte, die mit 60, 50 und 40 s sedimentieren, beschrieb Hoover die Bildung von zwei Dissoziationsprodukten. Auch in bezug auf die Ribonucleinsäuren stimmen die Resultate der beiden Gruppen nicht überein. Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse hatten sich auch an der einzelligen Grünalge *Acetabularia* ergeben.

3. Problemstellung

Nach allem sind die Berichte über das physikalisch-chemische Verhalten der Ribosomen in Grünalgen und Protozoen widersprüchlich. Das mag zu einem guten Teil darauf zurückzuführen sein, daß bisher nur fragmentarische Untersuchungen vorliegen. Aus diesem Grunde wurden systematische Untersuchungen der Ribosomen, insbesondere in bezug auf die Magnesiumunabhängigkeit, begonnen und auf die Ribonucleinsäuren ausgedehnt. Im Vordergrund stand das Problem des Dissoziationsverhaltens der vom Kern determinierten und der Chloroplastenribosomen. Als Objekt wurde die Grünalge *Dunaliella* gewählt, die wie *Chlamydomonas* in die Ordnung der grünen Flagellaten, der Volvocales, gehört. Stammesgeschichtlich handelt es sich um primitive Organismen, die sich am Ursprung der Entwicklungslinie von höheren Tieren und Pflanzen befinden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Zellmaterial

Bei den untersuchten Algen handelt es sich um eine nicht näher bestimmte Form von *Dunaliella*, die Herrn Prof. Dr. Schweiger vor einigen Jahren von Herrn Dr. Uhlig von der Biologischen Anstalt Helgoland zur Verfügung gestellt wurde.

Der Flagellat wurde 1838 von Dunal in den rotgefärbten Salzwasserbecken Südfrankreichs entdeckt und in die Gruppe der Chlamydomonadaceen eingereiht. Teodoresco erkannte, daß er im Unterschied zu *Chlamydomonas* keine feste Zellulosewand besitzt. Er bezeichnete ihn als *Dunaliella salina* und ordnete ihn bei den Polyblepharidaceen, den nackten Vertretern der Volvocales, ein (Hamburger 1905; Teodoresco 1905, 1906a, b). Lerche untersuchte eine Reihe von *Dunaliellen* unterschiedlicher Herkunft und versuchte, die Arten der Gattung neu zu klassifizieren und zu charakterisieren (Lerche 1937). Es stellte sich heraus, daß sich die Arten hauptsächlich in ihrer Größe und in den Ansprüchen an die optimale Salzkonzentration unterscheiden. Die Organismen zeigen aber eine große Variabilität und können weite Schwankungen im Salzgehalt ihres Mediums aushalten (Labbé 1921).

Die Zellen sind etwa $10\ \mu$ groß (Abb. 1). Sie sind nackt, besitzen also keine feste Zellulosewand. Charakteristisch ist der becherförmige Chloroplast mit einem großen Pyrenoid. In der Aushöhlung des Chloroplasten liegt der Zellkern mit Nucleolus. Im distalen Teil der Zellen befindet sich die Basis der beiden Geisseln, zwischen Geißelapparat und Kern liegt der Golgiapparat der Zelle (Werz u. Kellner 1970).

2. Zellkultur

Dunaliella wurde im Dauerlicht bei $18\ ^\circ\text{C}$ unter stetiger Belüftung kultiviert. Als Lichtquellen dienten vier Leuchtstoffröhren der Firma Philips TL 65 W/29. Die Zellen wuchsen in einem voll definierten Salzmedium (Tab. 1; McLachlan u. Yentsch 1959).

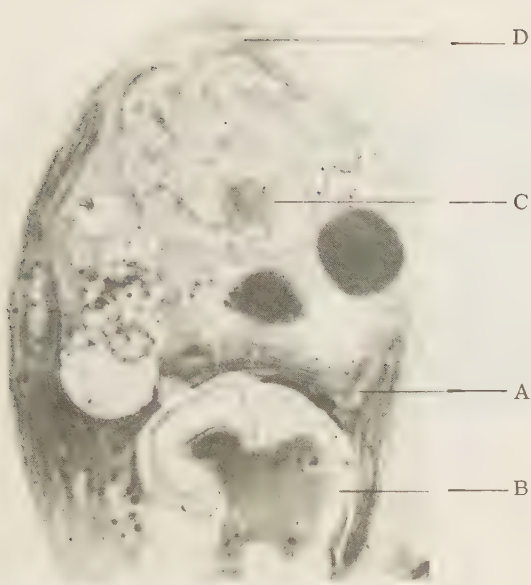


Abbildung 1: Dunaliella-Zelle

A: Chloroplast

B: Pyrenoid

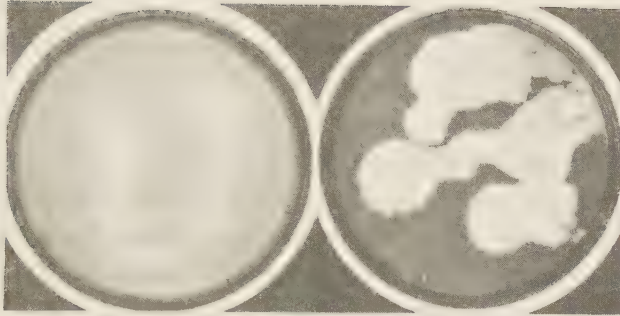
C: Zellkern

D: Golgiapparat

Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Werz zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Kulturmedium für *Dunaliella* (ASP-Medium, nach McLachlan u. Yentsch 1959)

NaCl	410 mM	FeCl₃ · 6 H₂O	1,5	μM
MgSO₄ · 7 H₂O	24 mM	H₃BO₃	185,0	μM
MgCl₂ · 6 H₂O	20 mM	MnCl₂ · 4 H₂O	7,0	μM
CaCl₂ · 2 H₂O	10 mM	ZnCl₂	0,8	μM
KNO₃	1 mM	CoCl₂ · 6 H₂O	0,02	μM
K₂HPO₄	100 μM	CuCl₂ · 2 H₂O	0,0002	μM
Na₂SiO₃ · 9 H₂O	100 μM	Na₂EDTA	30,0	μM



a

b

Abbildung 2 a: Plattenkultur von *Dunaliella*.

0,2 ml einer axenischen *Dunaliella*-Kultur wurden auf eine Agarplatte getropft, deren Medium pro Liter 8 g Difco-Nutrient-Broth, 8 g NaCl, 15 g Difco-Agar und 5 g Glucose enthielt. Die Platte wurde für zwei Wochen bei 18 °C im Dauerlicht inkubiert.

Abbildung 2 b: wie 2 a), aber insterile Kultur.

Für die Versuche wurden axenische Kulturen von *Dunaliella* verwendet. Zur Herstellung und Prüfung dieser Kulturen wurden etwa 0,2 ml einer *Dunaliella*-Kultur auf eine sterile Nähragarplatte getropft, deren Medium pro Liter Aq. dest. 8 g Difco-Nutrient-Broth, 8 g NaCl, 15 g Difco-Agar und 5 g Glucose enthielt. Zur Inkubation standen die Platten für ein bis zwei Wochen bei 18 °C im Dauerlicht. Sind die Kulturen insteril, dann sind die Auftropfstellen nach einiger Zeit mit Bakterien oder Pilzen zugewachsen (Abb. 2 b). Aus sterilen Kulturen entwickeln sich dagegen nach fünf bis sechs Tagen *Dunaliella*-Kolonien (Abb. 2 a). Zur Weiterzucht wurden einzelne Kolonien in steriles Kulturmedium abgeimpft. Diese ohne Belüftung heranwachsenden Kulturen dienten als Stammkulturen für die bei den Versuchen verwendeten größeren Kulturmengen, die in 5 Liter Erlenmeyerkolben herangezogen wurden. Ihre Belüftung erfolgte mit Hilfe einer Kompressorpumpe.

Vor jedem Experiment wurden die Kulturen auf Sterilität getestet.

3. Zellwachstum

Da Ribosomen und Ribonucleinsäuren aus Zellen einer definierten Wachstumsphase präpariert werden sollten, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der *Dunaliella*-Kulturen untersucht. Die Vermehrung der Zellzahl, die Trübung, der Protein- und Chlorophyllgehalt der Kultur wurden getestet.

Das Auszählen der *Dunaliella*-Kulturen erfolgte in einer Zählkammer nach Thoma, die Fixierung mit einigen Tropfen Formol. Die Trübung der Kultur wurde bei 600 m μ bei offenem Spalt in einem Spektralphotometer bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (Lowry et al. 1951), die des Chlorophylls nach der Methode von Arnon (Arnon 1949). Es wird die Summe von Chlorophyll a und b angegeben.

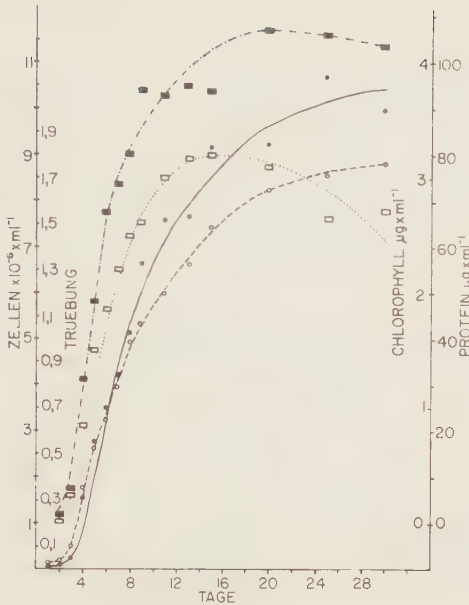


Abbildung 3: Wachstum einer *Dunaliella*-Kultur innerhalb von 30 Tagen.

Dunaliella-Zellen wurden in 5 Liter nicht sterilem Kulturmedium ("Erd-Schreiber") zu einer Konzentration von etwa 24000 Zellen/ml suspendiert und bei 18 °C mit Belüftung im Dauerlicht kultiviert. Während des Wachstums wurden Zellzahl (—●—), Trübung (----○----), Chlorophyll (.....□.....) und Proteingehalt (----■----) der Kultur bestimmt.

Die Versuche über das Zellwachstum wurden mit Erd-Schreiber als Medium (Schweiger 1969) unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Beimpfung zeigen die Zellen eine Verzögerungsphase von rund 24 Stunden (Abb. 3). Die Kultur bleibt dann für etwa vier Tage in der logarithmischen Phase. In dieser Zeit teilen sich die Zellen ungefähr zweimal in 24 Stunden. Danach geht die Kultur in eine spätlogarithmische Phase über. In der exponentiellen Wachstumsphase erreicht sie eine Zelldichte von 10^6 bis 2×10^6 Zellen/ml. Das entspricht im Spektralphotometer einer OD_{600} von 0,2 - 0,4. Für die Versuche wurden die Zellen am Ende der logarithmischen Phase verwendet.

4. Ribosomen

a) Präparation

Kulturmengen bis 500 ml wurden in einer Kühlzentrifuge, größere Volumina durch Abzentrifugieren bei Zimmertemperatur geerntet. Sämtliche folgenden Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 0 - 4 °C.

Die Zellen wurden einmal mit einer 1 M Sorbitlösung in TMK-Puffer (10^{-2} M Tris-HCl, pH 7,8; 10^{-2} M $MgCl_2$; 6×10^{-2} M KCl) gewaschen, mit TMK-Puffer (0,5 ml bei der Aufarbeitung von 500 ml Kultur), der 0,5 % Triton-X-100 zum Aufbrechen der Zellen enthielt, versetzt und fünf Minuten auf dem Mixomaten geschüttelt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß Zellen und Chloroplasten nach dieser Behandlung vollständig zerstört waren. Das Zellhomogenat wurde zur Entfernung von Kern-, Zellwand-, Chloroplasten- und Mitochondrienbruchstücken 20 Minuten bei 32000 g zentrifugiert. Der die Ribosomen enthaltende Überstand wurde abpipettiert, das Sediment erneut der gleichen Behandlung unterzogen und die Überstände vereinigt. Im Folgenden sind sie als DC 0 bezeichnet.

Zur Herstellung höher gereinigter Ribosomenpräparate aus einer größeren Zellmenge (ca. 5 g Naßgewicht) wurde diese in etwa 20 ml TMK-Puffer + 0,5 % Triton-X-100 aufgenommen und fünf Minuten mit der Hand geschüttelt. Das Zellhomogenat wurde mit 60 ml TMK-Puffer verdünnt und 30 Minuten bei 49000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und das Sediment noch einmal auf die gleiche Weise behandelt. Nach dem Vereinigen der Überstände wurden diese zweimal 15 Minuten bei 49000 g zentrifugiert.

Aus dem Überstand (DC 0) wurden die Ribosomen im Rotor 50 Ti bei 50000 UpM (226000 g) für 75 Minuten abzentrifugiert. Je nachdem, ob die Ribosomen noch einmal durch differentielle Zentrifugation gereinigt werden sollten oder nicht, wurden sie in einem größeren oder kleineren Volumen TMK-Puffer durch Schütteln auf dem Mixomaten resuspendiert. Die Ribosomensuspension wurde zur Entfernung aggregierter Teile 20 Minuten bei 32000 g abzentrifugiert. Der die Ribosomen enthaltende Überstand wird als DC 1 bezeichnet.

Die durch Wiederholung der Reinigungsschritte gewonnenen Präparate werden als DC 2, DC 3 usw. bezeichnet.

Ribosomen von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden z. T. von Herrn Prof. Dr. Zillig, Max-Planck-Institut für Biochemie in München, zur Verfügung gestellt. Für einige Experimente wurden Ribosomen aus gefrorenen *E. coli*-Zellen des RNase-freien Stamms MRE 600 von Boehringer präpariert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der Methode von Tissières (Tissières et al. 1959), mit dem Unterschied, daß als Isolierungspuffer "TMK" diente und die Zellen in einer Bühler-Zellmühle aufgebrochen wurden.

Die RNS-Konzentration der Ribosomenpräparate wurde bei 260 m μ gemessen ($OD_{260} = 1$ entspricht 50 μ g RNS/ml) und ihre Reinheit durch Aufnahme ihres Absorptionsspektrums von 230 bis 280 m μ geprüft.

b) Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Lineare Gradienten

Zur Auftrennung und Reinigung der Ribosomen im präparativen Maßstab diente der Rotor SW 25. Gekühlte lineare Gradienten von 5 - 30 % Saccharose (w/w) in TMK-Puffer wurden mit 1 ml Ribosomensuspension beschichtet und bei 2 °C für 8 Stunden bei 25000 UpM (90000 g) zentrifugiert. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte vom Boden her durch Unterschichten mit einer 2 M Saccharoselösung, die Fraktionen am Meniskus der Gradienten traten also zuerst aus dem Zentrifugenröhrchen aus. Die Extinktion der im Gradienten verteilten Ribosomen wurde kontinuierlich aufgezeichnet.

Exponentielle Gradienten

Für analytische Zwecke wurden die Ribosomen auf exponentiellen Gradienten zentrifugiert, die eine isokinetische Sedimentation der Ribosomen erlauben.

Bei linearen Gradienten nimmt die Zuckerviskosität mit steigender Entfernung vom Rotationszentrum stärker als die Zentrifugalkraft zu, so daß die Teilchen während der Sedimentation durch den Gradienten langsamer werden. Die exponentiellen Gradienten werden dagegen so berechnet, daß sich die beiden Kräfte kompensieren, so daß die Sedimentationsgeschwindigkeit der Teilchen konstant ist. Diese Methode steigert die analytische Fähigkeit der Gradienten und erlaubt es, die Sedimentationskoeffizienten der zu untersuchenden Partikel direkt aus

ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gradienten zu berechnen (McCarty et al. 1968; Noll 1967). Ferner ist es mit derartigen Gradienten einwandfrei möglich, die Sedimentationskoeffizienten einer unbekannten Komponente aus einem bekannten Standard zu berechnen (Martin u. Ames 1961).

Berechnung der exponentiellen Gradienten

Die Berechnung der exponentiellen Gradienten erfolgte für den Rotor SW 40 Ti für die in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen.

Bei der Berechnung kann man von der Wanderungsgeschwindigkeit eines Partikels des Sedimentationskoeffizienten s_{20w} und der Dichte ρ_p in einem Rotor, der mit der Winkelgeschwindigkeit ω dreht, bei einer beliebigen Entfernung x vom Rotationszentrum in einem Medium der Viskosität η_{tM} und der Dichte ρ_{tM} ausgehen:

$$(1) \quad \frac{dx}{dt} = s_{20w} \omega^2 x \frac{\eta_{20w}}{\eta_{tM}} \frac{\rho_p - \rho_{tM}}{\rho_p - \rho_{20w}}$$

η_{20w} und ρ_{20w} sind die Viskosität und die Dichte von Wasser bei 20 °C.

In dem gesuchten Gradienten soll die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel, also der Differentialquotient $\frac{dx}{dt}$, eine Konstante sein. Da für eine gegebene Partikeldichte der Bruch

$$(2) \quad \frac{\eta_{20w}}{\rho_p - \rho_{20w}} = a$$

konstant ist, wird die Forderung dann erfüllt, wenn der Ausdruck

$$(3) \quad x \frac{\rho_p - \rho_{tM}}{\eta_{tM}} = k$$

konstant wird. Durch Einsetzen von a und k in (1) erhält man

$$(4) \quad \frac{dx}{dt} = s_{20w} \omega^2 a k$$

Tabelle 2: Exponentielle Gradienten für Ribosomen und Ribonucleinsäuren

	Ribosomen	RNS
Rotortyp	SW 40 Ti	
Partikeldichte ρ_p	1,41 (g/ml)	1,89 (g/ml)
Temperatur	20 °C	
Saccharosekonz. am Meniskus (w/w)	5 ‰	
Gradientenvolumen	13 ml	
Abst. Meniskus-Rotationsz.	7,00 cm	
Abst. Boden-Rotationsz.	15,87 cm	
a	2,444	1,1258
k	2,384	5,316
a k	5,826	5,985
Mischkammer: Volumen	10,5 ml	8,9 ml
Sacch. konz. (w/w)	5 ‰	
Reservoir: Volumen	13 ml	
Sacch. konz. (w/w)	27,0 ‰	28,8 ‰

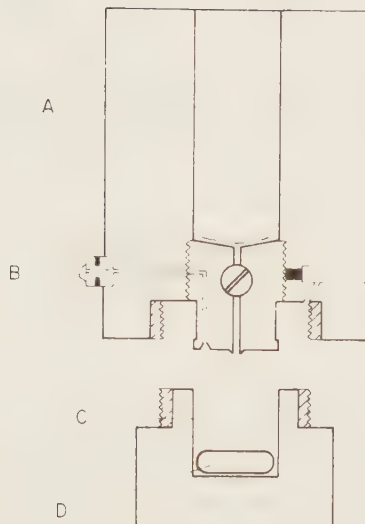


Abbildung 4: Gerät zur Herstellung exponentieller Gradienten
(Dillard unveröff.).

A: Reservoir

B: Auslauf

C: Mischkammer

D: Rührstab

Man berechnet k für eine bestimmte Saccharosekonzentration am Meniskus des Gradienten, für die die Entfernung x vom Rotationszentrum bekannt ist. Kennt man k , dann kann man die Entfernung willkürlich in einem Gradienten gewählter Saccharosekonzentrationen vom Rotationszentrum durch Einsetzen in (3) derart berechnen, daß der Differentialquotient $\frac{dx}{dt}$ konstant bleibt. Man erhält dabei einen exponentiell gekrümmten Gradienten, in dem Partikel einer bestimmten Dichte mit konstanter Geschwindigkeit wandern. Kennt man die Wanderungsstrecke dx der Partikel nach einer bestimmten Zentrifugationszeit dt , dann läßt sich unter Berücksichtigung der Winkelgeschwindigkeit ω des Rotors und der Konstanten a und k der Sedimentationskoeffizient der Partikel nach (4) berechnen.

Herstellung der exponentiellen Gradienten

Die Herstellung der exponentiellen Gradienten wurde nach dem von Noll angegebenen Prinzip und einer in unserem Institut entwickelten Methode vorgenommen (Dillard unveröff. ; Noll 1967). Man arbeitet mit einer Mischkammer konstanten Volumens v_{mix} , die eine Saccharoselösung einer Konzentration c_{mix} enthält (Abb. 4). c_{mix} entspricht der Saccharosekonzentration am Meniskus des Gradienten. Die Mischkammer steht durch eine Öffnung in ihrem oberen Teil mit einem Reservoir in Verbindung, in dem sich eine Saccharoselösung der Konzentration c_{res} und eines Volumens v_{res} , das dem Gradientenvolumen entspricht, befindet. Gibt man unter Rühren Saccharoselösung aus dem Reservoir in die Mischkammer, dann läuft die Saccharosemischung aus der Mischkammer durch eine Kapillare, die zum Boden eines Zentrifugenröhrchens reicht, in das zu beschickende Röhrchen. Die zuerst einlaufende leichte Saccharose wird durch die kontinuierlich konzentrierter werdende Saccharose unterschichtet. Es entsteht dabei ein exponentieller Gradient, der bei richtiger Wahl der Größen v_{mix} , c_{mix} , v_{res} und c_{res} dem theoretisch berechneten Gradienten entspricht.

Die Konzentration der Saccharoselösung, die aus dem System ausläuft, wenn b ml in das Zentrifugenröhrchen geflossen sind, wird nach Noll durch die Gleichung

$$(5) \quad c = c_{\text{mix}} e^{-\frac{b}{v_{\text{mix}}}} + c_{\text{res}} (1 - e^{-\frac{b}{v_{\text{mix}}}})$$

angegeben. Zur Berechnung der Saccharosekonzentration im Reservoir c_{res} und des Volumens der Mischkammer v_{mix} wird die Gleichung nach c_{res} aufgelöst:

$$(6) \quad c_{\text{res } 1} = c_{\text{res } 2} = \frac{\frac{c_1 - c_{\text{mix}} e^{-\frac{b_1}{v_{\text{mix}}}}}{1 - e^{-\frac{b_1}{v_{\text{mix}}}}} = \frac{\frac{c_2 - c_{\text{mix}} e^{-\frac{b_2}{v_{\text{mix}}}}}{1 - e^{-\frac{b_2}{v_{\text{mix}}}}}$$

Zur Lösung der Gleichung muß die Abhängigkeit des aus dem System auslaufenden Volumens b von der Saccharosekonzentration c bekannt sein. Die aus Gleichung (3) berechnete Abhängigkeit der Saccharosekonzentration von der Entfernung vom Rotationszentrum x muß also in eine Abhängigkeit von dem Volumen b, das den Gradienten bildet, umgerechnet werden. Da für den Boden des Zentrifugenröhrchens keine geometrische Formel angegeben werden kann, werden die Röhrchen mit einem Milliliter Flüssigkeit gefüllt und der Abstand vom Flüssigkeitsmeniskus zum Rotationszentrum bestimmt. Der Abstand des Meniskus vom Rotationszentrum des mit dem Gradientenvolumen gefüllten Röhrchens ist ebenfalls bekannt. Mit diesen Daten kann die Höhendifferenz, die einem Milliliter Flüssigkeit im Röhrchen entspricht, berechnet und die Abhängigkeit der Saccharosekonzentration vom Gradientenvolumen bestimmt werden (Abb. 5).

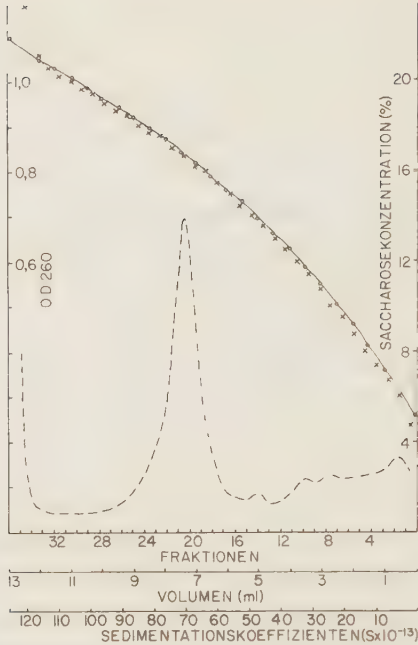


Abbildung 5: Zentrifugation von E. coli-Ribosomen in einem exponentiellen Gradienten.

Die Ribosomen wurden in TMK-Puffer präpariert. 0,1 ml des Präparats (= 50 μ g RNS/ml) wurden auf einen nach Tabelle 2 hergestellten Gradienten geschichtet und in einem Rotor SW 40 Ti 2 Stunden bei 20 °C und 40000 UpM (284000 g) zentrifugiert. Die Verteilung der Ribosomen im Gradienten (---x---) wurde durch Messung der Extinktion bei 260 m μ während der Fraktionierung kontinuierlich aufgezeichnet und diejenige der Saccharosekonzentration durch Messung der Refraktionsindizes einzelner Fraktionen des Gradienten bestimmt.

— o — Berechneter Gradient x..... Verwendeter Gradient

Setzt man in Gleichung (6) zwei willkürliche Volumina b_1 und b_2 mit den zugehörigen Zuckerkonzentrationen c_1 und c_2 ein, dann muß das Mischvolumen v_{mix} so lange verändert werden, bis die Reservoirkonzentration c_{res} auf beiden Seiten der Gleichung gleich groß ist.

Die Berechnungen und Kontrollen haben ergeben, daß die in Tabelle 2 angegebenen Saccharosekonzentrationen und Volumina Gradienten liefern, die mit den berechneten theoretischen Gradienten gut übereinstimmen.

Prüfung der exponentiellen Gradienten

Die Gradienten wurden mit E. coli-Ribosomen getestet. 0,1 ml Ribosomen in TMK-Puffer (entsprechend 50 μg RNS/ml) wurden auf den Gradienten geschichtet und 2 Stunden bei 20 °C und 40000 UpM (284000 g) zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte wie für den Rotor SW 25 beschrieben. Die Saccharosekonzentration jeder Fraktion wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Abb. 5 zeigt, daß der gebildete Gradient nur unwesentlich vom theoretischen Gradienten abweicht. Nach Formel (4) läßt sich für den Sedimentationskoeffizienten der E. coli-Ribosomen ein Wert von $72,3 \pm 0,3 \times 10^{-13}$ s errechnen. Der relativ hohe Wert des Sedimentationskoeffizienten ist vielleicht dadurch zu erklären, daß die Konzentration des exponentiellen Gradienten etwas unter derjenigen des berechneten liegt.

c) Zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Dunaliella-Ribosomen wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge des Typs Spinco Modell E mit Hilfe der Schlierenoptik untersucht. Als Präparat diente ein DC 1-Präparat in TMK-Puffer. Die Ribosomen wurden bei vier Verdünnungen im Rotor AN-H bei 36000 UpM und 20 °C zentrifugiert. Nach Erreichen der eingestellten Geschwindigkeit wurden

die Bilder in einem Abstand von 4 Minuten aufgenommen. Das Abzeichnen und Ausmessen der Platten erfolgte unter einem Vergrößerungsapparat, die Berechnung der apparenten Sedimentationskoeffizienten rechnerisch nach der Differentialform. Druck- und Verdünnungseffekt wurden nicht berücksichtigt. Aus den bei vier Ribosomenkonzentrationen errechneten scheinbaren Sedimentationskoeffizienten ließen sich die wahren Werte durch graphische Extrapolation bestimmen. Ein Faktor von 1,03 diente zur Umrechnung der $s_{20, TMK}$ -Werte in s_{20w} -Werte.

5. Ribonucleinsäuren

a) Präparation

Die RNS-Präparation wurde mit einigen Veränderungen nach einer Methode durchgeführt, die für die Präparation von RNS aus *Acetabularia* entwickelt wurde (Dillard unveröff. ; Ralph u. Bellamy 1964).

RNS aus ganzen Zellen von *Dunaliella*

Der Isolierungspuffer für die RNS besteht aus 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 5,0, 5 mM $MgCl_2$ und 0,05 % Polyvinylsulfat (PVS). Die Zellen wurden, wie für die Ribosomen beschrieben, gesammelt und einmal mit einer 1 M Sorbitlösung im Isolierungspuffer gewaschen. Sie wurden in 15 ml Isolierungspuffer, dem 2 % Na-Dodecylsulfat (SDS) zum Aufbrechen der Zellen zugesetzt waren, aufgenommen und kräftig gemischt. Nach dem Aufbrechen der Zellen wurden 15 ml einer Lösung, die 80 % Phenol, 20 % Isolierungspuffer und 0,1 % Hydroxychinolin enthielt, zum Zellhomogenat zugesetzt und fünf Minuten im Eisbad geschüttelt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 32000 g abzentrifugiert und der die RNS enthaltende Überstand noch einmal 10 Minuten mit 15 ml Phenol-lösung behandelt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Entfernung des restlichen Phenols aus der wässrigen Phase durch Ausschüttelung

mit einem Überschuß an Äther. Wurden über 1 g Dunaliella-Zellen in einem Arbeitsgang aufgearbeitet, dann wurde die die Nucleinsäuren enthaltende wässrige Phase mit der doppelten Menge 96 °o Alkohol überschichtet und die an der Grenzfläche ausfallende Desoxyribonucleinsäure (DNS) aufgespült und entfernt. Bei der Aufarbeitung kleinerer Zellmengen konnte die DNS durch Zugabe von 3 °o K-Acetat zum vergällten Alkohol in Lösung gehalten werden. Zum Ausfällen der RNS wurde die Mischung für mindestens zwei Stunden in ein -18 °C kaltes Methanolbad gestellt, die RNS abzentrifugiert und im Isolierungspuffer gelöst.

Zur weiteren Reinigung wurden zum RNS-Präparat gleiche Volumina einer 2,5 M K_2HPO_4 -Lösung, pH 7,5, und 3-Hydroxypropylmethyläther gegeben, stark geschüttelt und abzentrifugiert. Die die RNS enthaltende obere Phase wurde mit dem gleichen Volumen 0,2 M Na-Acetatlösung versetzt und zur Fällung der RNS ein halbes Volumen einer 1 °o Cetyltrimethylammoniumbromid-Lösung zugegeben. Nach dem Abzentrifugieren der ausgefällten RNS wurde sie zweimal mit einer 0,1 M Na-Acetatlösung in 70 °o Äthanol gewaschen und im Isolierungspuffer zu einer Konzentration von etwa 500 µg/ml gelöst.

RNS aus Ribosomen von Dunaliella

Die Ribosomen wurden vor ihrer Aufarbeitung auf RNS abzentrifugiert. Das Ribosomensediment wurde in 2 - 4 ml Isolierungspuffer, den 2 °o SDS zugesetzt waren, resuspendiert. Die Ausschüttelung mit Phenol erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Alkoholfällung wurde die RNS nicht weiter gereinigt.

RNS aus E. coli

Die RNS wurde aus E. coli-Ribosomen nach der für die Isolierung von RNS aus ganzen Dunaliella-Zellen beschriebenen Methode isoliert.

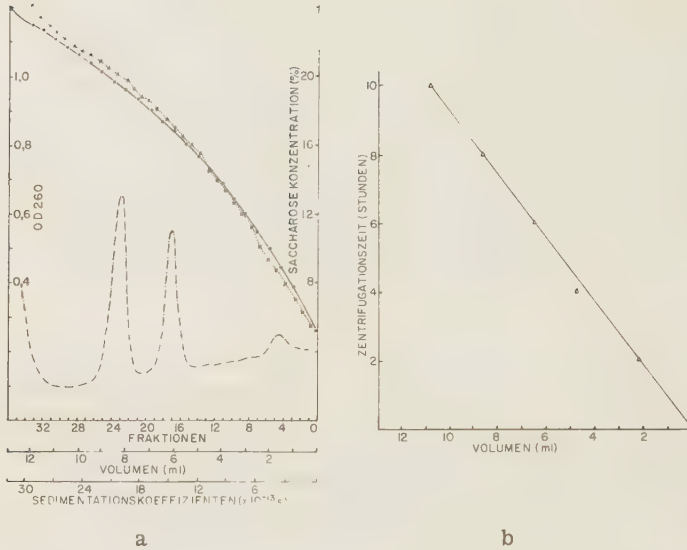


Abbildung 6 a: Zentrifugation von E. coli-RNS in einem exponentiellen Gradienten.

Die RNS wurde aus Ribosomen von E. coli präpariert. 0,1 ml des Präparats (= 50 μ g RNS/ml) wurden auf einen nach Tabelle 2 hergestellten Saccharosegradienten geschichtet und im Rotor SW 40 Ti 10 Stunden bei 20 °C und 34000 UpM (205000 g) zentrifugiert.

—○— Berechneter Gradient -.-.-.-.- Optische Dichte bei 260 mμ
.....x..... Verwendeter Gradient

Abbildung 6 b: Abhängigkeit der Wanderungsstrecke des 23 s Peaks der E. coli-RNS von der Zentrifugationszeit.

Die Rotorgeschwindigkeit betrug 40000 UpM (284000g); sonstige Bedingungen wie Abb. 6 a).

Konzentration und Reinheit der RNS wurden im Spektralphotometer geprüft.

b) Zentrifugation im exponentiellen Gradienten

Die Zusammensetzung und die Sedimentationskoeffizienten der RNS wurden auf exponentiellen Gradienten untersucht, die für den Rotor SW 40 Ti nach der für Ribosomen angegebenen Methode und für die in Tabelle 2 aufgezeichneten Bedingungen berechnet worden waren (Dillard unveröff.). Die Saccharoselösungen wurden mit Isolierungspuffer, dem zur Hemmung von Ribonucleasen 0,5 % SDS zugegeben waren, angesetzt.

Die exponentiellen Gradienten wurden mit RNS aus *E. coli* auf isokinetische Sedimentation getestet. 50 μ g RNS in 0,1 ml Isolierungspuffer wurden auf den Gradienten geschichtet und 10 Stunden bei 20 °C und 34000 UpM (205000 g) zentrifugiert. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte wie bei den Ribosomen beschrieben.

Der Konzentrationsverlauf des Gradienten stimmt hinreichend genau mit der theoretischen Kurve überein (Abb. 6 a). Um zu testen, inwieweit die RNS mit konstanter Geschwindigkeit durch den Gradienten läuft, wurde sie für verschiedene Zeiten bei 40000 UpM (284000 g) und 20 °C im Gradienten zentrifugiert. Trägt man für den 23 s Peak die Zentrifugationszeit gegen die Wanderungsstrecke des Peaks im Gradienten auf, dann erhält man in guter Näherung eine Gerade, die man bei isokinetischer Sedimentation erwartet (Abb. 6 b).

Die Sedimentationskoeffizienten der *E. coli*-RNS wurden nach Formel (4) berechnet. Unter den Versuchsbedingungen errechnet sich für die schwere RNS ein Wert von $20,8 \pm 0,1 \times 10^{-13}$ s, für die leichte RNS ein Wert von $15,2 \pm 0,05 \times 10^{-13}$ s.

Diese Zahlen zeigen zwei Dinge:

(1) Die Sedimentationskoeffizienten der beiden RNS-Peaks liegen dichter zusammen, als es dem Verhältnis 23 : 16 entspricht. Setzt man die schwere E. coli-RNS willkürlich als 23 s, dann errechnet sich für die leichte RNS ein Wert von $16,8 \pm 0,03 \times 10^{-13}$ s. Auch Küntzel und Noll haben mit den von ihnen berechneten exponentiellen Saccharosegradienten ähnliche Werte für E. coli-RNS gefunden (Küntzel u. Noll 1967).

(2) Die nach Formel (4) errechneten Sedimentationskoeffizienten der E. coli-RNS liegen weiter unter den bekannten Werten, als dies nach der Form der exponentiellen Gradienten erwartet werden kann. Läßt man jedoch das SDS aus den Gradienten fort, dann sedimentiert die E. coli-RNS etwas schneller, und man erhält Sedimentationskoeffizienten, die ungefähr mit den in der Literatur angegebenen Werten übereinstimmen.

c) Zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten der RNS in der analytischen Ultrazentrifuge erfolgte mit Hilfe der UV-Optik mit der Technik der Band-Zentrifugation (Studier 1965). Dazu wurde die RNS in einen 0,01 M Na-Acetat-Puffer, pH 4,6, der 0,1 M NaCl enthielt, gebracht und auf eine Konzentration von etwa 120 - 240 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. 15 μl der Probe wurden während eines Laufs auf eine Lösung geschichtet, die 0,1 M NaCl in 50 % D_2O enthielt. Die Proben wurden mit 36000 UpM zentrifugiert und die Aufnahmen im Abstand von 8 Minuten gemacht. Die Berechnung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach der Differentialform unter Einführung eines Faktors von 1,2 für D_2O .

ERGEBNISSE

A. Ribosomen aus Dunaliella-Zellen

1. Absorptionsspektrum der Ribosomenpräparate

Das Zellhomogenat (DC 0) ist nach dem Abzentrifugieren der Zellbruchstücke durch das im Präparat vorhandene Chlorophyll dunkelgrün gefärbt. Es zeigt im Ultravioletten ein Absorptionsspektrum, dessen Maximum und Minimum bei 270 bzw. 245 m μ liegen (Abb. 7). Der Extinktionsquotient 280 : 260 m μ von 0,87 läßt schließen, daß eine beachtliche Menge Protein im Präparat enthalten ist (Tab. 3).

Zentrifugiert man die Ribosomen ab und resuspendiert sie in TMK-Puffer, dann ist das Präparat (DC 1) immer noch intensiv grün gefärbt. Maximum und Minimum liegen bei 265 bzw. 245 m μ , und der Quotient 280 : 260 m μ hat einen Wert von etwa 0,78. Reinigt man die Ribosomen durch differentielle Zentrifugation weiter, dann erhält man immer reinere Präparate, verliert aber auch Material, da sich die Ribosomensedimente nicht quantitativ resuspendieren lassen. Nach viermaligem Abzentrifugieren der Ribosomen (DC 4) ist das Präparat zwar immer noch leicht grün gefärbt, enthält aber nur noch etwa 60⁰/₁₀₀ Protein, und das Absorptionsspektrum der Ribosomen entspricht demjenigen von *E. coli*-Ribosomen.

2. Ribosomenklassen aus Dunaliella und ihre Sedimentationskoeffizienten

Im exponentiellen Saccharosegradienten zeigen verschieden weit gereinigte Ribosomenpräparate keine ins Gewicht fallenden Unterschiede in bezug auf ihr Sedimentationsmuster (Abb. 8 a). Nur die DC 0 unterscheidet sich von den anderen Präparaten durch eine hohe Extinktion bei

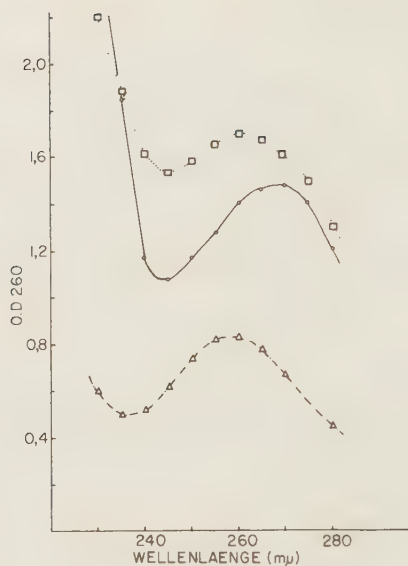


Abbildung 7: Absorptionsspektren unterschiedlich weit gereinigter Ribosomenpräparate aus *Dunaliella*.

Dunaliella-Zellen wurden in TMK-Puffer aufgebrochen, die Grobpartikelfraktion abzentrifugiert und das Absorptionsspektrum des Überstands gemessen (DC 0 Ribosomen). Die Ribosomen wurden einmal (DC 1 Ribosomen) bzw. viermal (DC 4 Ribosomen) durch differentielle Zentrifugation gereinigt und die Absorptionsspektren der Präparate bestimmt.

—○— DC 0 Ribosomen
□..... DC 1 Ribosomen
 -.-.-Δ-.-.- DC 4 Ribosomen

Tabelle 3:

Reinigungsstufe	Extinktionsquotient 280 : 260 m μ
DC 0	0,870
DC 1	0,778
DC 4	0,542

Veränderung des Extinktionsquotienten 280 : 260 m μ mit fortlaufender Reinigung der Dunaliella-Ribosomen. Die Reinigung der Ribosomen wurde nach der in Abb. 7 beschriebenen Methode durchgeführt.

Tabelle 4:

	a	b	c
Berechnung aus	$s_{20w} = \frac{dx}{dt \cdot \omega^2 \cdot ak}$ (s x 10 ⁻¹³)	n. M. u. A. (St: 70 s E. coli) (s x 10 ⁻¹³)	Anal. Ultraz. (s x 10 ⁻¹³)
Zahl der Läufe	24	17	3
"80 s"	83,8 ± 0,5	80,9 ± 0,4	77,9 ± 0,5
"60 s"	62,3 ± 0,6	60,3 ± 0,5	62,2 ± 6,8
"50 s"	50,2 ± 0,3	48,8 ± 0,4	52,0 ± 2,6
"40 s"	38,7 ± 0,4	37,4 ± 0,2	
			30,2 ± 1,5
			22,7 ± 1,3
"18 s"	18,6 ± 0,2	17,8 ± 0,6	

Sedimentationskoeffizienten der Ribosomenklassen von *Dunaliella*.

Spalte a: Die Berechnung erfolgte aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Ribosomenklassen im exponentiellen Saccharosegradienten nach Formel (4).

Spalte b: Die Berechnung erfolgte durch Vergleich mit 70 s E. coli-Ribosomen als Standard. E. coli- und *Dunaliella*-Ribosomen wurden zu diesem Zweck im gleichen oder in parallelen Röhrchen in exponentiellen Gradienten zentrifugiert.

Spalte c: Berechnungen aus Läufen in der analytischen Ultrazentrifuge.

Die angegebenen Fehler sind mittlere Fehler des Mittelwertes.

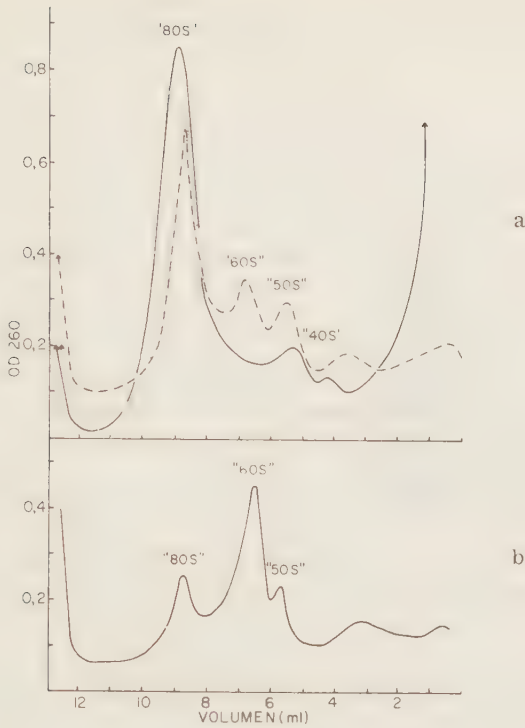


Abbildung 8 a: Zentrifugation unterschiedlich weit gereinigter Ribosomenpräparate von *Dunaliella* in exponentiellen Saccharosegradienten.

Reinigung der Ribosomen wie Abb. 7), Zentrifugationsbedingungen nach Abb. 5). Die Präparate wurden sofort nach der Herstellung zentrifugiert.

———— DC 0 Ribosomen DC 1 Ribosomen
 - - - - - DC 4 Ribosomen

Abbildung 8 b: Zentrifugation der DC 4 Ribosomen nach 5 Tage langer Lagerung auf Trockeneis.



Abbildung 9: Zentrifugation von Dunaliella-Ribosomen in der analytischen Ultrazentrifuge.

DC 1 Ribosomen von Dunaliella wurden in TMK-Puffer präpariert und in einer analytischen Ultrazentrifuge (Modell E) mit Hilfe der Schlierenoptik untersucht. Die Probe wurde im Rotor AN-H bei 36000 UpM und 20 °C zentrifugiert, die Aufnahme 8 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit gemacht. Sedimentation von links nach rechts. (Vgl. auch Tab. 4; der große Peak entspricht den "80 s" Ribosomen).

260 m μ am Meniskus des Gradienten, die auf die in den Präparaten vorhandenen Proteine, Chlorophylle und Carotinoide zurückzuführen sein dürfte.

Die Sedimentationskoeffizienten der in den Präparaten vorhandenen Ribosomenpeaks wurden aus Läufen in exponentiellen Saccharosegradienten mit und ohne internen Standard (70 s Ribosomen von *E. coli*) und in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt (Tab. 4).

Dunaliella-Ribosomen zeigen im exponentiellen Saccharosegradienten einen Hauptpeak, der schneller als die 70 s Ribosomen von *E. coli* sedimentiert und zur Klasse der 80 s Ribosomen gehört (Abb. 8 a). In einigen Fällen ist dieser Peak nicht symmetrisch, sondern bildet zum Meniskus eine Schulter, die in der 70 s Region des Gradienten liegt. Ein weiterer Peak sedimentiert mit etwa 60 s, tritt aber im allgemeinen nicht stark hervor. Regelmäßig ist ein 50 s Peak vorhanden. Er hat etwa ein Viertel der Größe des 80 s Peaks und sedimentiert etwas langsamer als die schwere Untereinheit der *E. coli*-Ribosomen. Zum Meniskus hin folgt im allgemeinen ein kleinerer Peak, der mit etwa 40 s sedimentiert. 30 s Partikel wurden nur in ganz wenigen Läufen gefunden. Mit großer Regelmäßigkeit findet sich aber dicht am Meniskus ein Peak, der mit etwa 18 s sedimentiert. In der DC 0 wird er oft durch die am Meniskus ansteigende Extinktion verdeckt, in der DC 1 tritt er dagegen gut hervor.

Daß es sich bei den beschriebenen Peaks um Ribosomen bzw. RNS-Material handelt, läßt sich aus dem Quotienten 280 : 260 entnehmen.

Das Bild in der analytischen Ultrazentrifuge ähnelt demjenigen im Gradienten (Abb. 9). Während die 80 s Ribosomen bei allen getesteten

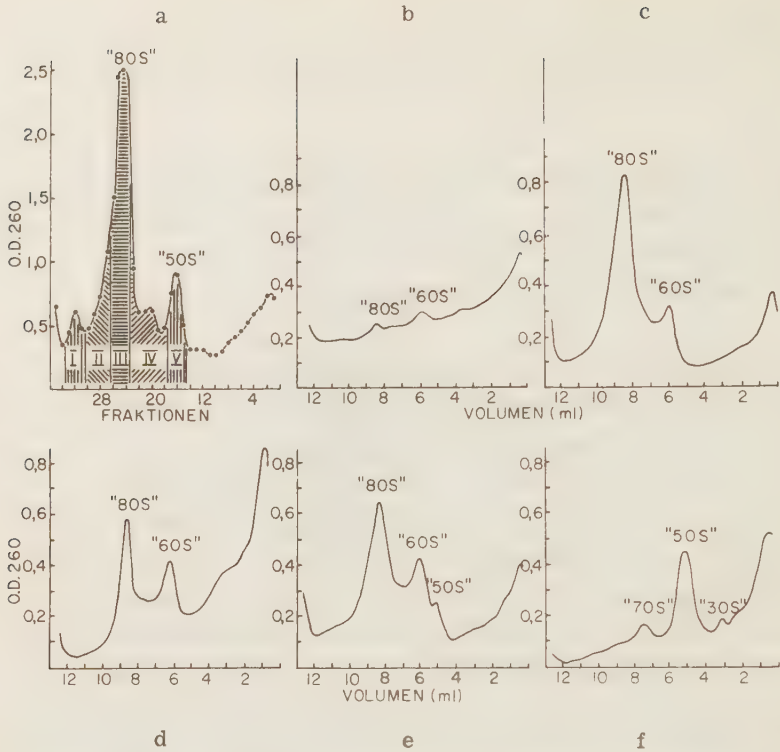


Abbildung 10 a: Isolierung der Ribosomenklassen von *Dunaliella*.

DC 1 Ribosomen von *Dunaliella* wurden in TMK-Puffer präpariert und auf linearen Saccharosegradienten (5 - 30 o/w) im SW 25 Rotor 8 Stunden bei 2 $^{\circ}\text{C}$ und 25000 UpM zentrifugiert. Die angegebenen Fraktionen wurden gesammelt, die Ribosomen aus ihnen isoliert und nach den Bedingungen von Abb. 5 auf exponentiellen Saccharosegradienten rezentrifugiert.

Abbildung 10 b: Rezentrifugation von Fraktion I (Ribosomenaggregate).

Abbildung 10 c: Rezentrifugation von Fraktion II.

Abbildung 10 d: Rezentrifugation von Fraktion III ("80 s Ribosomen").

Abbildung 10 e: Rezentrifugation von Fraktion IV ("60 und 70 s Ribosomen").

Abbildung 10 f: Rezentrifugation von Fraktion V ("50 s Ribosomen").

Verdünnungen als einheitlicher Peak laufen, kommt es bei den leichteren Ribosomenklassen durch das Verdünnen zu einer Aufspaltung der Peaks. Der in der analytischen Ultrazentrifuge mit 30,2 s sedimentierende Peak ist eine Schulter des 22,7 s Peaks und bildet sich erst bei stärkerer Verdünnung aus. Ob der 22,7 s Peak Protein oder RNS-Material enthält und ob er dem 18 s Peak im Gradienten entspricht, ist nicht klar.

3. Stabilität der Ribosomenpräparate

Bewahrt man Ribosomenpräparate von *Dunaliella* für einige Tage bei 0 °C auf, dann verändern sie ihr Profil im Saccharosegradienten nicht. Nach längerer Zeit aggregieren die Partikel jedoch und fallen aus. Bei Aufbewahrung der DC 4 Ribosomen für fünf Tage in einem Methanol/Trockeneis-Gemisch ergeben sich auffällige Veränderungen (Abb. 8 b). Die 80 s Partikel sind fast völlig verschwunden, der 60 s Peak ist dafür größer geworden, während die Höhe des 50 s Peaks unverändert geblieben ist. 40 s Ribosomen tauchen im Gradienten nicht auf.

4. Isolierung der Ribosomenklassen und Rezentrifugation im exponentiellen Gradienten

Der 80 s Peak ist in einigen Fällen nicht symmetrisch, sondern bildet zum Meniskus eine Schulter. Um nachzuprüfen, ob dieser und die übrigen Peaks aus einheitlichem Material bestehen, wurden die Ribosomenklassen von *Dunaliella* in einem linearen Gradienten voneinander getrennt und in exponentiellen Saccharosegradienten rezentrifugiert.

Aus 16 Litern *Dunaliella*-Kultur (9 g Zellen Naßgewicht) wurde eine DC 1 präpariert und auf linearen Saccharosegradienten im Rotor SW 25 für 8 Stunden bei 2 °C und 25000 UpM (90000 g) zentrifugiert (Abb. 10 a). Das Ribosomenprofil entspricht demjenigen im

exponentiellen Gradienten: Ein 80 s Peak, ein kleiner 60 s Peak und ein 50 s Peak. Zwischen dem Boden des Röhrchens und den 80 s Ribosomen findet man einen zusätzlichen Peak, mutmaßlich Aggregate.

Folgende, in Abbildung 10 a angegebene Fraktionen wurden gesammelt: Ribosomenaggregate (Fraktion I), Ribosomen von der schweren Seite des 80 s Peaks (Fraktion II), 80 s Ribosomen (Fraktion III), 60 und 70 s Ribosomen (Fraktion IV) und 50 s Ribosomen (Fraktion V). Die einzelnen Fraktionen wurden mit etwa der gleichen Menge TMK-Puffer verdünnt und 3 Stunden bei 50000 UpM (226000 g) abzentrifugiert. Die Ribosomensedimente wurden in 0,4 ml TMK-Puffer resuspendiert, 20 Minuten bei 32000 g zentrifugiert und auf exponentiellen Gradienten untersucht.

Bei der Rezentrifugation der 80 s Ribosomen (Fraktion III; Abb. 10 d) erhält man wieder einen 80 s Peak. Daneben taucht regelmäßig ein 60 s Peak auf, 50 und 40 s Ribosomen sind nicht nachzuweisen. Zwischen 80 und 60 s Peak findet man ein Plateau, das auf Material in der 70 s Region hinweist. Relativ viel langsamer sedimentierendes Material liegt am Meniskus des Gradienten.

Um zu prüfen, ob es sich bei den neben dem 80 s Peak auftretenden 60 s Ribosomen um Verunreinigungen handelt, die bei der Auftrennung der Ribosomenklassen durch ungenügende Trennung in die 80 s Fraktion gelangt sind, oder ob die 80 s Ribosomen während der Isolierung gespalten worden sind, wurden Ribosomenaggregate (Fraktion I) und die Ribosomen aus der schweren Hälfte des 80 s Peaks (Fraktion II) im exponentiellen Gradienten rezentrifugiert (Abb. 10 b, c). In beiden Fällen findet man einen 80 und einen 60 s Peak. Dieses kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß die neben den 80 s gefundenen

60 s Ribosomen nicht aus gegenseitigen Verunreinigungen im linearen Gradienten stammen. Ein deutlicher 40 s Peak tritt nicht auf.

Bei der Rezentrifugation der Summe der 60 und 70 s Ribosomen (Fraktion IV; Abb. 10 e) tritt regelmäßig ein 80 s Peak auf, der aus der Verunreinigung der 60 und 70 s Region des Gradienten mit 80 s Ribosomen herrührt. Ein 70 s Peak wird nicht gefunden. Regelmäßig sind dagegen 60 und 50 s Ribosomen vorhanden, bei den einzelnen Experimenten allerdings in unterschiedlicher Menge. In einigen Fällen überwiegen die 60 s Ribosomen, so daß der 50 s Peak nur als Schulter auftaucht. In anderen Fällen dominiert der 50 s Peak. In einigen Experimenten taucht in der 30 s Region des Gradienten ein kleiner Peak auf.

Sammelt man die 50 s Ribosomen (Fraktion V) und rezentrifugiert sie (Abb. 10 f), dann findet man einen 50 s Peak wieder. Er ist auf beiden Seiten von zwei kleinen Peaks flankiert, die mit 71,4 s und 28,0 s sedimentieren.

Die Versuche zeigen, daß es nicht möglich ist, aus der 70 s Region des Gradienten Ribosomen zu sammeln, die mit 70 s sedimentieren. Dagegen erhält man aus dieser Region u. a. 50 s Ribosomen. Ribosomen aus der 50 s Region liefern dagegen bei der Rezentrifugation neben 50 und 30 s Ribosomen einen kleinen, aber regelmäßig anwesenden 70 s Peak. Ferner zeigt sich, daß 80 s Ribosomen unter den verwendeten Bedingungen nicht zu 50 s Ribosomen abgebaut werden.

5. 80 s Ribosomen von Dunaliella bei Mg^{2+} -Konzentrationen unter $10^{-2} M$
Der Einfluß niedriger Mg^{2+} -Konzentrationen auf 80 s Ribosomen wurde untersucht, um die einzelnen Ribosomenklassen, die bei $10^{-2} M Mg^{2+}$ auftreten, zu charakterisieren.

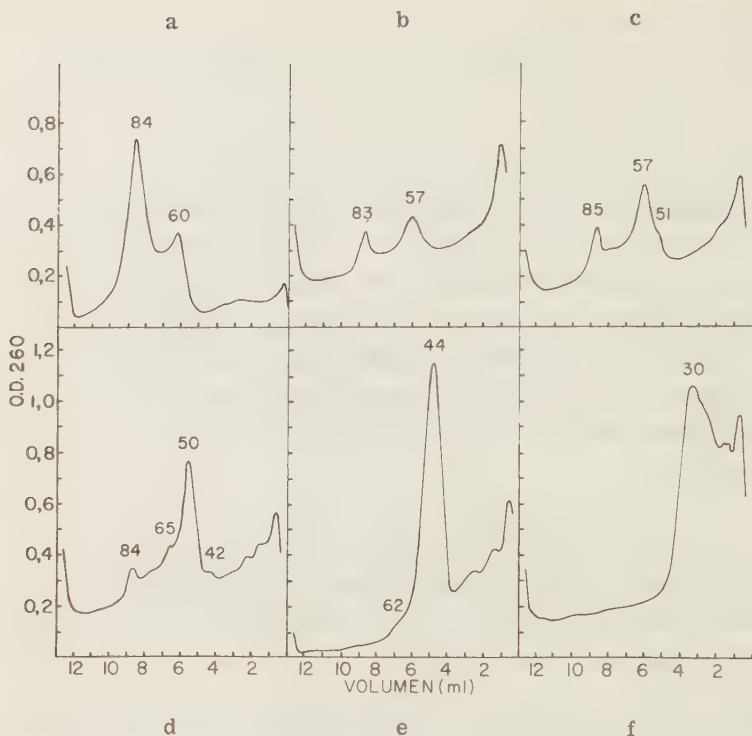


Abbildung 11: 80 s Ribosomen von *Dunaliella* bei Mg^{2+} -Konzentrationen unter 10^{-2} M.

80 s Ribosomen (Fraktion III) wurden nach Abb. 10) isoliert und in Tris/Kalium-Puffer mit unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen (Abb. 11 a - 11 e) oder in Phosphatpuffer resuspendiert. Sie wurden auf exponentiellen Gradienten, die mit den entsprechenden Puffern angesetzt waren, getestet. Zentrifugationsbedingungen nach Abb. 5).

Abbildung 11 a: 10^{-2} M Mg^{2+} (Kontrolle)

Abbildung 11 b: 5×10^{-3} M Mg^{2+}

Abbildung 11 c: 3×10^{-3} M Mg^{2+}

Abbildung 11 d: 10^{-3} M Mg^{2+}

Abbildung 11 e: 10^{-4} M Mg^{2+}

Abbildung 11 f: 10^{-2} M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,5.

Die 80 s Ribosomen wurden, wie im letzten Abschnitt beschrieben, durch Sammeln aus einem linearen Gradienten und Abzentrifugieren isoliert. Die Ribosomensedimente wurden in 0,5 ml TMK-Puffer resuspendiert, durch Zentrifugation von Aggregaten befreit und für 24 Stunden bei 4 °C gegen 1 Liter TK-Puffer (10^{-2} M Tris/HCl, pH 7,8; 6×10^{-2} M KCl) dialysiert. Dem TK-Puffer wurden folgende Mg^{2+} -Konzentrationen zugesetzt: 10^{-2} M (Kontrolle); 5×10^{-3} M; 3×10^{-3} M; 10^{-3} M; 10^{-4} M. Nach der Dialyse wurden die Ribosomen in exponentiellen Saccharosegradienten, die mit entsprechenden Puffern angesetzt waren, untersucht. In einer anderen Versuchsreihe wurden die 80 s Ribosomensedimente sofort in Puffern mit den angegebenen Mg^{2+} -Konzentrationen aufgenommen. Die Resultate beider Experimente entsprechen einander.

Die Rezentrifugation der 80 s Ribosomen bei 10^{-2} M Mg^{2+} ist im letzten Abschnitt beschrieben worden (Abb. 11 a). Erniedrigt man die Mg^{2+} -Konzentration auf 5×10^{-3} M, dann erhält man wie in TMK-Puffer einen "80 s" (83 s) und einen "60 s" (57 s) Peak (Abb. 11 b). Der "60 s" Peak ist aber im Verhältnis zum "80 s" Peak größer geworden. Ein "40 s" Peak tritt nicht auf. Bei weiterer Verminderung der Mg^{2+} -Konzentration auf 3×10^{-3} M verschiebt sich das Mengenverhältnis von "80 s" (85 s) zu "60 s" (57 s) Ribosomen weiter zu Gunsten der "60 s" Ribosomen. In der "50 s" (51 s) Region findet man eine Schulter (Abb. 11 c).

Bei 10^{-3} M Mg^{2+} sind die "80 s" Ribosomen weitgehend abgebaut (Abb. 11 d). Der größte Teil der Ribosomen sedimentiert in der "50 s" Region (50,4 s). Zwischen dem kleinen "80 s" (84 s) und dem "50 s" Peak liegt ein Plateau, auf dem man zwei kleine Ribosomengipfel unterscheiden kann. Der "50 s" Peak zeigt eine deutliche Schulter in

der "40 s" Region (42 s). Bei 10^{-4} M Mg^{2+} sind keine "80 s" Ribosomen mehr nachweisbar (Abb. 11 e). Die Hauptmenge der Ribosomen sedimentiert mit etwa 44 s.

In weiteren Versuchen wurde die Mg^{2+} -Konzentration durch Behandlung der 80 s Ribosomen mit EDTA oder mit Phosphat-Puffer herabgesetzt. "80 s" Ribosomen wurden in TMK-Puffer ($EDTA\ 10^{-2}$ M) für 1 Stunde bei $0^{\circ}C$ inkubiert. Im exponentiellen Gradienten zeigen die Ribosomen das gleiche Bild wie nach der Dialyse gegen 10^{-4} M Mg^{2+} (vgl. Abb. 11 e). Es bildet sich ein Peak, der etwas schneller als 40 s sedimentiert. Da man das gleiche Resultat bei der Dialyse von "80 s" Ribosomen gegen einen Puffer, der kein Magnesium enthält, erhält, kann man annehmen, daß es sich bei der 44 s Form der Ribosomen um ein relativ stabiles Zwischenprodukt handelt.

Nimmt man die 80 s Ribosomen in einem 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,5, nach Sörensen auf, dann entstehen Teilchen mit einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 30 s (Abb. 11 f).

Die Versuche zeigen, daß bei der Behandlung von 80 s Ribosomen mit niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen immer nur ein Peak auftritt. Beim Übergang von höheren zu niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen wird der Sedimentationskoeffizient dieses Peaks immer geringer. Die Abnahme des Sedimentationskoeffizienten geht stufenweise vor sich.

6. Ribosomen aus *Dunaliella* bei Mg^{2+} -Konzentrationen über 10^{-2} M
Experimente, die mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M und einer KCl-Konzentration von 6×10^{-2} M durchgeführt wurden, haben keine eindeutigen Hinweise auf das Vorkommen von 70 s Ribosomen in den Ribosomenpräparaten von *Dunaliella* erbracht. Da es bekannt ist, daß

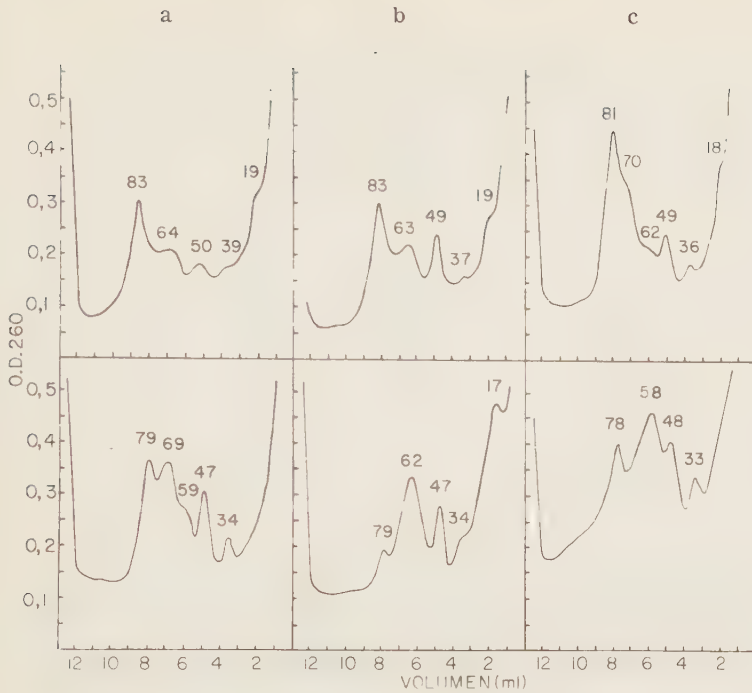


Abbildung 12: Dunaliella-Ribosomen bei Mg^{2+} -Konzentrationen über 10^{-2} M.

DC 0 Ribosomen wurden durch Aufbrechen der Zellen in den unten angegebenen Puffern gewonnen und auf exponentiellen Gradienten, die mit den entsprechenden Puffern angesetzt waren, getestet. Zentrifugationsbedingungen nach Abb. 5).

Abb. 12 a: 10^{-2} M $MgCl_2$; 6×10^{-2} M KCl; 10^{-2} M Tris/HCl, pH 7,8 (Kontrolle)

Abb. 12 b: 2×10^{-2} M $MgCl_2$; $2,5 \times 10^{-2}$ M KCl; $2,5 \times 10^{-2}$ M Tris/HCl, pH 7,5

Abb. 12 c: 4×10^{-2} M $MgCl_2$; " ; "

Abb. 12 d: 6×10^{-2} M $MgCl_2$; " ; "

Abb. 12 e: 8×10^{-2} M $MgCl_2$; " ; "

Abb. 12 f: 10^{-1} M $MgCl_2$; " ; "

70 s Ribosomen gegen hohe Quotienten einwertiger zu zweiwertiger Kationen sehr empfindlich sind, wurde in den folgenden Versuchen die Mg^{2+} -Konzentration stufenweise erhöht, während die K^{+} -Konzentration auf $2,5 \times 10^{-2}$ M herabgesetzt wurde. Folgende Puffer wurden verwendet:

	$MgCl_2$	KCl	Tris/HCl	pH
(1)	10^{-2} M	6×10^{-2} M	10^{-2} M	7,8(Kontrolle)
(2)	2×10^{-2} M	$2,5 \times 10^{-2}$ M	$2,5 \times 10^{-2}$ M	7,5
(3)	4×10^{-2} M	"	"	"
(4)	6×10^{-2} M	"	"	"
(5)	8×10^{-2} M	"	"	"
(6)	10^{-1} M	"	"	"

In einer Versuchsreihe wurden mit Hilfe der angegebenen Puffer DC 0 Ribosomen präpariert und auf exponentiellen Gradienten, die mit den entsprechenden Puffern angesetzt waren, zentrifugiert. In einem anderen Experiment wurden die Ribosomen in TMK-Puffer präpariert und abzentrifugiert. Die Ribosomensedimente wurden dann in den angegebenen Puffern resuspendiert, durch Zentrifugation von Aggregaten befreit und auf exponentiellen Gradienten getestet. DC 0 und DC 1 Ribosomen verhalten sich ähnlich. Die Menge der wiedergefundenen Ribosomen, gemessen an der Summe der Flächen unter den Ribosomenpeaks, ist bei allen Mg^{2+} -Konzentrationen etwa gleich groß (Abb. 13).

Bei 2×10^{-2} M Mg^{2+} und $2,5 \times 10^{-2}$ M KCl (Puffer (2)) zeigen die Ribosomen das gleiche Profil wie bei der Verwendung von TMK-Puffer (Puffer (1)). Man findet Peaks in der 80s, 60s, 50s und 40 s, nicht dagegen in der 70 s Region des Gradienten (Abb. 12 a, b). Erst wenn man die Mg^{2+} -Konzentration auf 4×10^{-2} M erhöht, erhält man in der 70 s Region eine deutliche Schulter (Abb. 12 c).

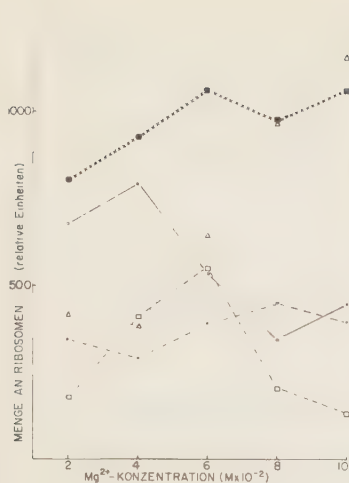


Abb. 13

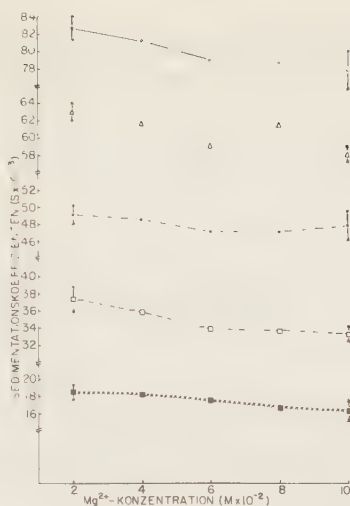


Abb. 14

Abbildung 13: Veränderung der in den Ribosomenpräparaten von *Dunaliella* vorhandenen Ribosomenmengen der einzelnen Klassen bei Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-1} M.

Die Ribosomenmenge wurde aus Experimenten nach Abb. 12) als Fläche unter den entsprechenden Peaks bestimmt. —○— 80 s Ribosomen; ----□---- 70 s Ribosomen;Δ..... 60 s Ribosomen; -.-.-.-●-.-.-.- 50 s Ribosomen; xxxxx ■ xxxxx Halbe Summe der Ribosomen.

Abbildung 14: Veränderung der Sedimentationskoeffizienten der Ribosomenklassen von *Dunaliella* bei Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-1} M.

Experimente nach Abb. 12). Die Sedimentationskoeffizienten wurden aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Peaks im Gradienten nach

$$s_{20w} = \frac{dx}{dt \omega^2 a k} \text{ berechnet.}$$

—○— 80 s Ribosomen;Δ..... 60 s Ribosomen; -.-.-.-●-.-.-.- 50 s Ribosomen; ----□---- 40 s Ribosomen; xxxxx ■ xxxxx 18 s Material.

Bei weiterer Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration auf 6×10^{-2} M sedimentiert die Hauptmenge der Partikel nicht mehr mit 80 s, sondern mit 60 und 70 s (Abb. 12 d). In einigen Experimenten überwiegen die 60 s Partikel stark, so daß die 70 s Ribosomen nur als Schulter hervortreten.

Bei 8×10^{-2} M und 10^{-1} M Mg^{2+} findet man einen kleinen 80 s Peak, 70 s Ribosomen sind nicht mehr nachzuweisen, der Hauptteil der Ribosomen sedimentiert mit etwa 60 s (Abb. 12 e, f).

Während also bei Mg^{2+} -Konzentrationen um 10^{-2} M die 80 s Ribosomen im Präparat überwiegen, tritt bei Konzentrationen von $4 - 5 \times 10^{-2}$ M eine 70 s Komponente auf, die bei weiterer Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration durch 60 s Ribosomen abgelöst wird (Abb. 13).

Zwei Dinge fallen bei diesen Experimenten auf:

(1) Die Menge an 50 s Ribosomen bleibt bei allen Mg^{2+} -Konzentrationen ungefähr konstant (Abb. 13).

(2) Die Sedimentationskoeffizienten einer Ribosomenklasse werden mit steigender Mg^{2+} -Konzentration kleiner. So sinkt der Wert für die 80 s Ribosomen von $83,1 \pm 0,9 \times 10^{-13}$ s in TMK-Puffer auf $78,0 \pm 0,7$ s in einem Puffer mit 10^{-1} M Mg^{2+} (Abb. 14).

Um zu prüfen, ob sich aus der Schulter in der 70 s Region, die sich bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 4×10^{-2} M (Puffer (3)) ausbildet, 70 s Ribosomen isolieren lassen, wurden DC 1 Ribosomen in diesem Puffer präpariert. Sie wurden nach der in Abschnitt 4 beschriebenen Methode auf linearen Gradienten zentrifugiert und die 80 s und die 60 und 70 s

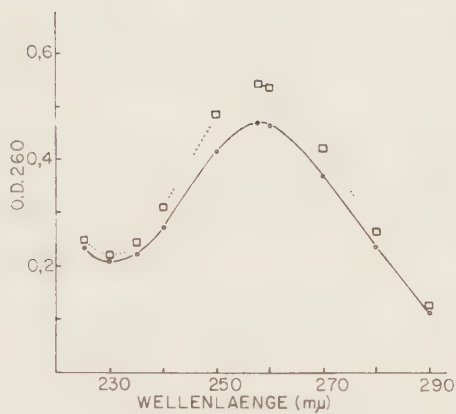


Abbildung 15: Absorptionsspektrum von Dunaliella- und E. coli-RNS.

Dunaliella-RNS wurde aus ganzen Zellen von Dunaliella, E. coli-RNS aus E. coli-Ribosomen präpariert.

—————o————— Dunaliella-RNS

.....□..... E. coli-RNS

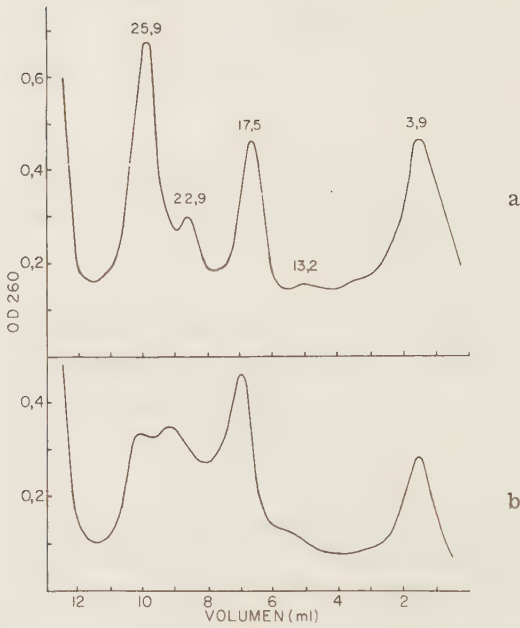


Abbildung 16 a: Zentrifugation von RNS aus *Dunaliella*-Zellen in exponentiellen Gradienten.

Zentrifugationsbedingungen nach Abb. 6 a). Dem Gradientenpuffer wurden zur Hemmung von RNasen 0,5 % Na-Dodecylsulfat zugesetzt.

Abbildung 16 b: Wie 16 a), jedoch ohne Zusatz von Na-Dodecylsulfat.

Ribosomen isoliert. Die beiden Ribosomenfraktionen wurden in Puffer (3) resuspendiert und auf exponentiellen Gradienten getestet.

Bei der Rezentrifugation der 80 s Ribosomen läßt sich im Unterschied zur Rezentrifugation in TMK-Puffer neben dem 60 s Peak auch ein 40 s Peak als Zerfallsprodukt der 80 s Ribosomen nachweisen. Dies zeigt, daß die 80 s Ribosomen von *Dunaliella* aus zwei Untereinheiten bestehen, die mit 60 und 40 s sedimentieren.

Bei der Rezentrifugation der 60 und 70 s Ribosomen zeigt sich aber auch hier kein 70 s Peak, sondern nur ein ausgeprägter 50 s Peak. Auch bei niedrigeren K^+/Mg^{2+} -Quotienten ist es also nicht möglich, 70 s Ribosomen zu isolieren.

B. Ribonucleinsäuren aus *Dunaliella*-Zellen

1. RNS aus ganzen Zellen von *Dunaliella*

a) Absorptionsspektrum der RNS

Das Absorptionsspektrum der RNS aus *Dunaliella* entspricht demjenigen der *E. coli*-RNS. Das Absorptionsminimum liegt bei 230 m μ , das Maximum bei 258 m μ und das Verhältnis der Extinktion von 280 : 260 m μ beträgt etwa 0,5 (Abb. 15).

b) Sedimentationskoeffizienten und Sedimentationsprofil der RNS

Wie bereits oben erläutert, lassen sich die Sedimentationskoeffizienten der *E. coli*-RNS nur bei Abwesenheit von SDS aus der Lage der Peaks im exponentiellen Gradienten berechnen. Auf der anderen Seite wird aber *Dunaliella*-RNS in einem Saccharosegradienten ohne SDS bei 20 °C abgebaut (Abb. 16 b). Deshalb wurden die Berechnungen der

Tabelle 5:

a		b	
<u>Exponentielle Gradienten</u>		<u>Analytische Ultrazentrifuge</u>	
E. coli-RNS ($\times 10^{-13}$ s)	Dunaliella-RNS ($\times 10^{-13}$ s)	E. coli-RNS ($\times 10^{-13}$ s)	Dunaliella-RNS ($\times 10^{-13}$ s)
n = 20	n = 20	n = 5	n = 4
23=Standard	25,9 $\pm$ 0,07	23,0 $\pm$ 0,1	26,5 $\pm$ 0,6
	22,9 $\pm$ 0,07		
	17,5 $\pm$ 0,08		16,7 $\pm$ 0,3
16,8 $\pm$ 0,03		16,4 $\pm$ 0,2	
	13,2 $\pm$ 0,08		
	3,9 $\pm$ 0,08		

Sedimentationskoeffizienten von Dunaliella- und E. coli-RNS aus Berechnungen aus exponentiellen Gradienten und der analytischen Ultrazentrifuge.

Spalte a: Die Berechnung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte durch Vergleich mit der 23 s RNS von E. coli als internem Standard.

Spalte b: Die Sedimentationsanalysen wurden mit der Technik der "Band-Zentrifugation" durchgeführt.

n = Zahl der Läufe

Die angegebenen Fehler sind mittlere Fehler des Mittelwertes.

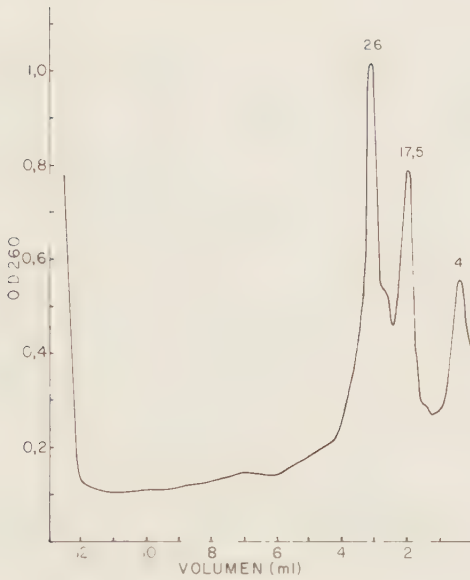


Abbildung 17: Zentrifugation von RNS aus *Dunaliella*-Zellen in exponentiellen Saccharosegradienten.

Die RNS wurde für 135 Minuten bei 40 000 UpM (284000 g) zentrifugiert. Sonstige Zentrifugationsbedingungen wie Abb. 6).

Sedimentationskoeffizienten der Dunaliella-RNS mit dem 23 s Peak von *E. coli* als internem Standard durchgeführt (Martin u. Ames 1961; Tabelle 5, Spalte a).

Zentrifugiert man Dunaliella-RNS durch einen exponentiellen Saccharosegradienten (Abb. 16 a), dann erhält man einen Peak, der die anderen überragt und mit etwa 25,9 s sedimentiert. Zum Meniskus hin zeigt er eine Schulter, die in den meisten Fällen einen eigenen Peak bildet und fast genau mit der schweren *E. coli*-RNS zusammenfällt. Im Gradienten folgt dann ein etwas breiterer Peak, der nur wenig schneller als die leichte *E. coli*-RNS sedimentiert. Während diese in dem verwendeten System einen Sedimentationskoeffizienten von 16,8 s hat, sedimentiert der Dunaliella-Peak mit 17,5 s. In der 13 s Region des Gradienten findet man in vielen Fällen einen kleineren und unter dem Meniskus einen relativ hohen Peak, der mit etwa 4 s sedimentiert.

In der analytischen Ultrazentrifuge lassen sich in den RNS-Präparaten nur zwei Banden eindeutig identifizieren, die schneller als die beiden Komponenten der ribosomalen RNS aus *E. coli* sedimentieren (Tabelle 5, Spalte b).

Bei kürzeren Laufzeiten im Saccharosegradienten wurde gezeigt, daß in Dunaliella schneller als mit 26 s sedimentierende Komponenten nicht in nennenswerter Konzentration vorkommen (Abb. 17).

c) Einfluß von Nucleasen

Zum Nachweis, daß es sich bei dem untersuchten Material tatsächlich um RNS handelt, wurden die RNS-Präparate für eine Stunde bei 30 °C mit RNase (100 µg/ml) behandelt, die zur Entfernung der DNase eine Stunde auf 90 °C erhitzt worden war (Abb. 18 a). Nach der RNase-

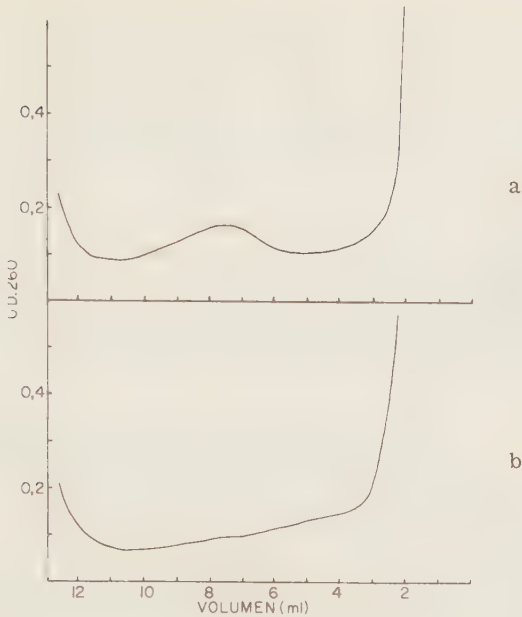


Abbildung 18 a: Zentrifugation von RNase behandelter Dunaliella-RNS im exponentiellen Gradienten.

Das RNS-Präparat wurde für 1 Stunde bei 30 °C mit RNase (100 µg/ml, 1 Stunde auf 90 °C erhitzt) behandelt. Pro Gradient wurden 200 µg des verdauten Materials zentrifugiert. Sonstige Zentrifugationsbedingungen wie Abb. 6a).

Abbildung 18 b: Wie 18 a), jedoch Verdauung des RNS-Präparates mit 100 µg RNase und 100 µg DNase/ml für 1 Stunde bei 30 °C.

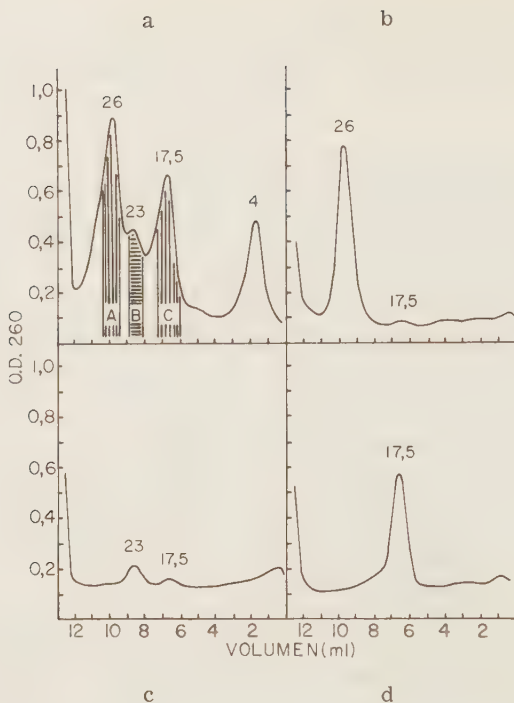


Abbildung 19 a: Isolierung der RNS-Komponenten von *Dunaliella*.

Dunaliella-RNS wurde auf exponentiellen Saccharosegradienten zentrifugiert, die angegebenen Fraktionen gesammelt und die RNS aus ihnen gefällt. Die RNS-Komponenten wurden auf exponentiellen Gradienten rezentrifugiert. Zentrifugationsbedingungen wie Abb. 6 a).

Abbildung 19 b: Rezentrifugation von Fraktion A (26 s RNS).

Abbildung 19 c: Rezentrifugation von Fraktion B (23 s RNS).

Abbildung 19 d: Rezentrifugation von Fraktion C (17,5 s RNS).

Behandlung sind die in der Kontrolle vorhandenen RNS-Peaks verschwunden. Zurück bleibt ein breiter, flacher Peak zwischen dem 17,5 und dem 23 s Peak der Dunaliella-RNS, dessen Lage etwas variiert. Er kommt im RNS-Profil von Dunaliella nicht zum Vorschein, da er im Background verschwindet.

Zur weiteren Identifizierung dieses Peaks wurde die Dunaliella-RNS gleichzeitig mit je 100 µg RNase und DNase/ml für 1 Stunde bei 30 °C behandelt. Nach der Behandlung mit DNase ist auch der nach RNase-Behandlung zurückbleibende Peak verschwunden (Abb. 18 b).

d) Mengenverhältnisse der RNS-Komponenten

Das Mengenverhältnis der einzelnen RNS-Komponenten ist bei allen Präparaten ungefähr konstant. Die Menge der 23 s RNS beträgt ungefähr 30 % derjenigen der 26 s RNS. Die Menge der 17,5 s RNS ist immer etwas größer als die Hälfte der Summe der 23 und 26 s RNS. Dies könnte darauf hindeuten, daß ein Teil der 26 oder 23 s RNS während der Präparation zu 17,5 s RNS abgebaut wird. Die Menge der 4 s RNS schwankt im Verhältnis zur Summe der schneller sedimentierenden RNS-Komponenten stärker. In einigen Fällen ist fast soviel 4 s RNS wie hochmolekulare RNS vorhanden, im allgemeinen sind es 30 - 40 %.

e) Isolierung und Rezentrifugation der RNS-Komponenten

Um weitere Aufschlüsse über das gegenseitige Verhältnis der einzelnen RNS-Komponenten zu erhalten, wurde Dunaliella-RNS in exponentiellen Saccharosegradienten zentrifugiert und die 26 s (Fraktion A), 23 s (Fraktion B) und 17,5 s RNS (Fraktion C) gesammelt (Abb. 19 a).

Die RNS wurde aus den Fraktionen durch Zugabe der doppelten Menge vergällten Alkohols, dem 3 % K-Acetat zugesetzt waren, ausgefällt. Sie wurde dann abzentrifugiert und im Isolierungspuffer gelöst. Die

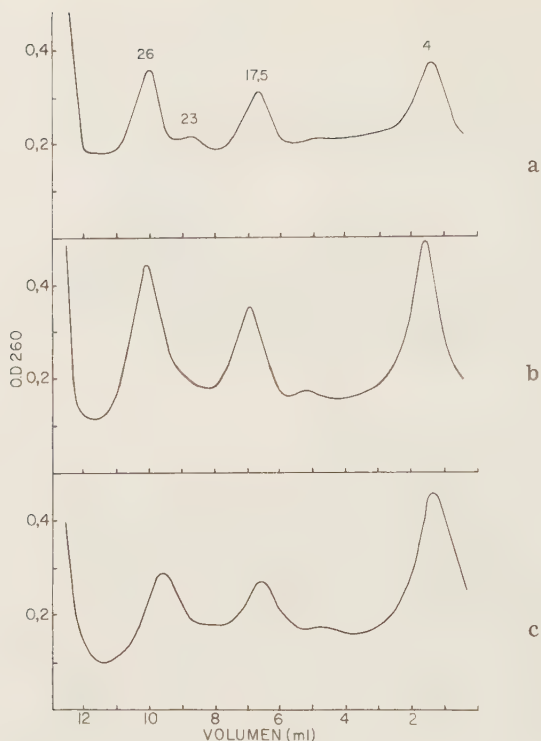


Abbildung 20: Endogener Abbau von Dunaliella-RNS.

RNS-Proben wurden nach unterschiedlich langer Lagerung bei -18°C bzw. bei 25°C auf exponentiellen Saccharosegradienten zentrifugiert. Zentrifugationsbedingungen wie Abb. 6 a).

Abbildung 20 a: Zentrifugation nach 6 Monate langer Lagerung bei -18°C .

Abbildung 20 b: Zentrifugation nach 14stündiger Lagerung bei 25°C .

Abbildung 20 c: Zentrifugation nach 50stündiger Lagerung bei 25°C .

einzelnen Fraktionen wurden auf exponentiellen Gradienten getestet.

Bei der Rezentrifugation der 26 s RNS erhält man im wesentlichen einen 26 s Peak (Abb. 19 b). In der 17,5 s Region liegt ein kleiner Peak, bei dem es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt der 26 s RNS handelt.

Die 23 s RNS liefert bei der Rezentrifugation einen 23 s und einen 17,5 s Peak (Abb. 19 c). Es kann sein, daß sie ebenso wie die 26 s RNS in geringem Maße zu 17,5 s RNS degradiert wird.

Bei der Rezentrifugation der 17,5 s RNS erhält man nur einen 17,5 s Peak. Auch bei längeren Zentrifugationszeiten wird er nicht in mehrere Komponenten aufgespalten (Abb. 19 d).

Die Ergebnisse lassen die Möglichkeit offen, daß unter den verwendeten Bedingungen die 26 und die 23 s RNS in geringem Maße zur 17,5 s RNS abgebaut werden. Es kommt aber nicht zu einer Degradation der 26 s RNS zu 23 s RNS.

f) Endogene Degradation der RNS

Ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei der 23 s RNS nicht um ein Abbauprodukt der 26 s RNS handelt, folgt aus Versuchen, bei denen *Dunaliella*-RNS für längere Zeit einer Temperatur von 25 °C ausgesetzt wurde. Während man die RNS für mindestens 6 Monate bei -18 °C halten kann, ohne daß sich ihr Profil im Gradienten oder das Mengenverhältnis der RNS-Komponenten verändert (Abb. 20 a), kommt es bei 25 °C zuerst zu einem Abbau des 23 s Peaks (Abb. 20 b), dem ein allmählicher Abbau des 26 s Peaks folgt (Abb. 20 c).

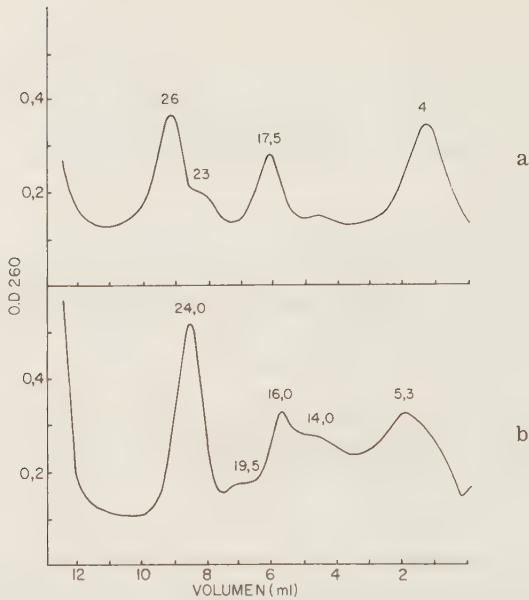


Abbildung 21: Dunaliella-RNS aus ganzen Dunaliella-Zellen im Vergleich mit RNS aus Dunaliella-Ribosomen ("TMK-Ribosomen").

Abbildung 21 a: Zentrifugation von RNS aus Dunaliella-Zellen in exponentiellen Gradienten.

Abbildung 21 b: Zentrifugation von RNS aus Dunaliella-Ribosomen in exponentiellen Gradienten.

DC 1 Ribosomen von Dunaliella wurden nach den Angaben von Abb. 7) in TMK-Puffer präpariert und aus ihnen die RNS isoliert. Die Zentrifugationszeit betrug 9 Stunden, sonstige Bedingungen wie Abb. 6 a).

2. RNS aus Ribosomen von Dunaliella

a) RNS aus Gesamt-Ribosomen

RNS aus "TMK-Ribosomen"

DC 1 Ribosomen wurden, wie in "Material und Methoden" beschrieben, präpariert. Ein Teil der Ribosomen wurde in TMK-Puffer resuspendiert und im exponentiellen Saccharosegradienten getestet. Aus einem anderen Teil wurde RNS präpariert. Die auf diese Weise präparierten Ribosomen zeigen ein Sedimentationsprofil, wie es oben beschrieben worden ist. Sie sind also physikalisch weitgehend intakt.

Die aus den Ribosomen isolierte RNS (Abb. 21 b) entspricht dagegen nicht dem RNS-Profil, das man aus ganzen Zellen erhält (Abb. 21 a). Sie ist zumindest teilweise degradiert. Der in ganzen Zellen beobachtete 26 s Peak tritt nicht auf. Man findet statt dessen ein einheitliches RNS-Material, das etwas schneller als der 23 s Peak von *E. coli*, aber deutlich langsamer als der 26 s Peak von *Dunaliella* sedimentiert. Im Vergleich mit dem 23 s Peak von *E. coli* errechnet sich für ihn ein Sedimentationskoeffizient von 24,0 s. An Stelle der 17,5 s RNS aus ganzen Pflanzen findet man unterschiedliche Abbauprodukte, die langsamer als die leichte *E. coli*-RNS sedimentieren. Im allgemeinen ist ein Peak vorhanden, der mit 16,0 s läuft und eine Schulter in der 14 s Region hat. In einem Experiment war die leichte *Dunaliella*-RNS vollständig abgebaut. Am Meniskus findet man einen Peak, der aus heterogenem Material besteht und etwas schneller als die 4 s RNS aus ganzen Zellen sedimentiert. Die Versuche weisen darauf hin, daß die Ribosomen unter den gewählten Präparationsbedingungen zwar physikalisch intakt sind, aber eine geschädigte RNS besitzen.

RNS aus "TMKMP-Ribosomen"

Weitere Versuche, intakte RNS aus *Dunaliella*-Ribosomen zu präparieren,

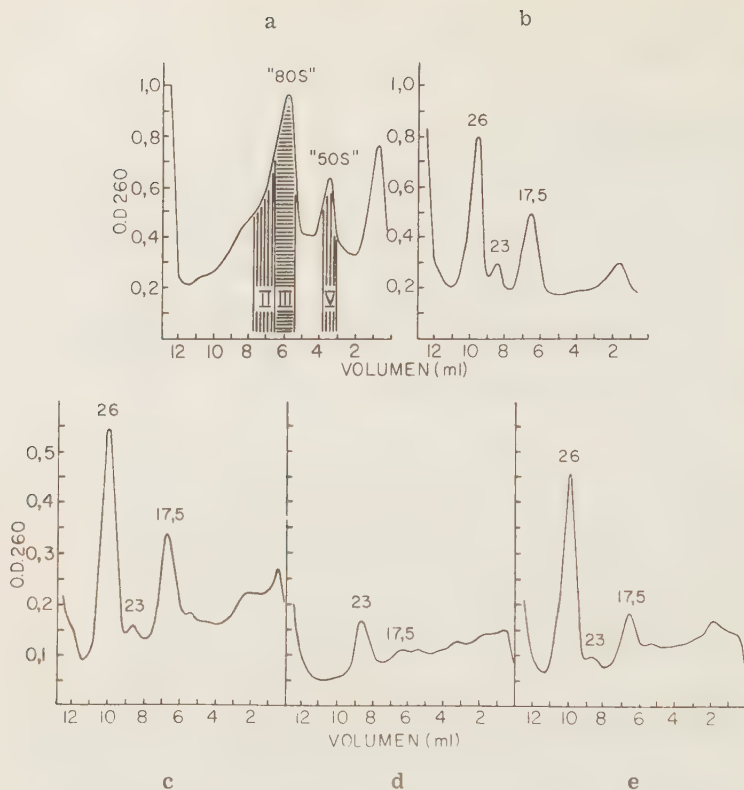


Abbildung 22 a: Zentrifugation von DC 1-Ribosomen aus *Dunaliella* in exponentiellen Gradienten.

Die Ribosomen wurden mit Merkaptoäthanol und Polyvinylsulfat präpariert ("TMKMP-Ribosomen") und bei 2 °C zentrifugiert. Sonstige Zentrifugationsbedingungen wie Abb. 5). Die bezeichneten Fraktionen wurden gesammelt, die Ribosomen aus ihnen abzentrifugiert und RNS aus den Ribosomen präpariert.

Abbildung 22 b: RNS aus Gesamt-TMKMP-Ribosomen.

Abbildung 22 c: RNS aus Fraktion III ("80 s Ribosomen").

Abbildung 22 d: RNS aus Fraktion V ("50 s Ribosomen").

Abbildung 22 e: RNS aus Fraktion II (Ribosomenaggregate).

wurden mit einem modifizierten Puffer durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden zum TMK-Puffer (10^{-2} M Tris/HCl, pH 7,8, 10^{-2} M MgCl_2 , 6×10^{-2} M KCl) 6×10^{-3} M Merkaptoäthanol (TMKM-Puffer) und zur Hemmung der RNasen 50 μg Polyvinylsulfat/ml (TMKMP-Puffer) zugesetzt. Da die Experimente Hinweise erbracht hatten, daß die Isolierung von RNS aus Ribosomen aus älteren Kulturen nicht ohne Degradation möglich ist, wurden die Versuche mit jungen Kulturen vorgenommen, deren Trübung einen Wert von $\text{OD}_{600} = 0,2$ nicht überschritt.

Die Ribosomen wurden folgendermaßen präpariert: Die Zellen von 4 l Kultur wurden abzentrifugiert, mit 1 M Sorbit in TMKM-Puffer gewaschen und in 10 ml TMKMP-Puffer, dem 0,5 % Triton-X-100 zugesetzt waren, durch Schütteln aufgebrochen. Nach Verdünnung mit 10 ml TMKM-Puffer wurde 30 Minuten bei 49000 g abzentrifugiert, das Sediment noch einmal der gleichen Behandlung unterzogen, die Überstände vereinigt und die Ribosomen für 75 Minuten bei 50000 UpM (226000 g) sedimentiert. Ein Teil der Ribosomen wurde in TMKMP-Puffer resuspendiert, durch Zentrifugation von Aggregaten befreit und auf exponentiellen Gradienten in TMKM-Puffer für 2 Stunden bei 40000 UpM (284000 g) und 2°C im Rotor SW 40 Ti zentrifugiert. Ein anderer Teil der Ribosomen wurde auf RNS aufgearbeitet.

Die nach dieser Methode präparierten Ribosomen zeigen ein etwas anderes Sedimentationsprofil als die in TMK-Puffer präparierten (Abb. 22 a). Neben einem deutlichen 80 s und 50 s Peak findet man Material dicht unter dem Meniskus. Zwischen dem 80 s Peak und dem Boden des Röhrchens befindet sich aggregiertes Material.

Die aus diesen Ribosomen präparierte RNS entspricht genau derjenigen aus ganzen Zellen (Abb. 22 b). Die Sedimentationskoeffizienten und die Flächen unter den Peaks sind in beiden Fällen gleich. Im Unterschied

zur RNS aus ganzen Pflanzen findet man aber am Meniskus nur einen kleinen Peak.

b) RNS aus den Ribosomenklassen

Die Gesamtribosomen der Zelle wurden, wie oben beschrieben, in TMKMP-Puffer präpariert und auf exponentiellen Gradienten in der Kälte zentrifugiert. Danach wurden die Gradienten fraktioniert und Ribosomenaggregate (Fraktion II), 80 s Ribosomen (Fraktion III) und 50 s Ribosomen (Fraktion V) gesammelt (Abb. 22 a). Die Ribosomen wurden aus den Fraktionen für drei Stunden bei 50000 UpM (226000 g) sedimentiert, aus den Sedimenten die RNS dargestellt und durch exponentielle Gradienten zentrifugiert.

RNS aus 80 s Ribosomen

Aus 80 s Ribosomen (Fraktion III) läßt sich eine RNS isolieren, die ungefähr derjenigen aus der Gesamtheit der Ribosomen und aus ganzen Zellen entspricht (Abb. 22 c). Man findet einen 26 s, einen 23 s und einen 17,5 s Peak und unterschiedliche, langsamer sedimentierende Abbauprodukte. Das Größenverhältnis des 23 zum 26 s Peak ist bei der RNS aus 80 s Ribosomen zugunsten der 26 s Komponente verschoben.

RNS aus 50 s Ribosomen

Aus 50 s Ribosomen (Fraktion V) kann eine 23 s RNS isoliert werden (Abb. 22 d). Neben dieser Hauptkomponente findet man mehr oder weniger 17,5 s RNS und weitere RNS-Komponenten, die langsamer sedimentieren. Da das Mengenverhältnis der 17,5 s RNS zur 23 s RNS von Präparation zu Präparation stark schwankt, kann angenommen werden, daß die 17,5 s RNS ein Abbauprodukt der 23 s RNS ist.

RNS aus Ribosomenaggregaten

Um zu prüfen, ob die aus 80 s Ribosomen isolierte 23 s RNS ein Abbauprodukt der 26 s RNS ist oder aus 70 s Ribosomen stammt, die nicht

vollständig von den 80 s Ribosomen abgetrennt worden sind, wurde RNS aus den im Gradienten vorhandenen Ribosomenaggregaten (Fraktion II) präpariert. Diese RNS zeigt, wie diejenige aus Gesamtribosomen und aus 80 s Ribosomen, einen 26 s und einen 17,5 s Peak (Abb. 22 e). Der 23 s Peak ist dagegen nur sehr schwach ausgebildet und im Verhältnis zur 26 s RNS sehr viel kleiner als bei RNS aus 80 s oder Gesamtribosomen. Dieses Resultat ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die 23 s RNS kein Abbauprodukt der 26 s RNS ist.

DISKUSSION

1. Das Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten *Dunaliella*-Zellen besitzen eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen biologischen Objekten, die sie für biochemische Untersuchungen besonders geeignet machen.

(1) Die Zellen sind anspruchslos und wachsen auf einem voll definierten Medium. Man erhält daher ein Zellmaterial, das in bezug auf Entwicklung und physiologischen Zustand gut definiert ist.

(2) Die Kulturen wachsen innerhalb weniger Tage zu Zelldichten von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml heran.

(3) *Dunaliella* läßt sich auf Agarplatten ziehen, so daß es leicht ist, Sterilkulturen der Alge anzulegen.

(4) Die Zellen sind nackt und können daher schnell, schonend und vollständig mit Hilfe geringer Konzentrationen an Detergentien aufgebrochen werden. Dem Isolierungsmedium zugesetzte Substanzen, wie etwa RNase-Hemmer, kommen sofort an den Ort ihrer Wirkung, so daß die Möglichkeit der Degradation der zu untersuchenden Strukturen vermindert wird.

Ein Problem wirft dagegen die Tatsache auf, daß bei *Dunaliella* der einzige, becherförmige Chloroplast der Zellmembran dicht anliegt. Wird durch Detergensbehandlung die Zellmembran zerstört, dann zerbricht auch der Chloroplast, so daß eine saubere Trennung von Grundplasma und Chloroplast schwierig ist. Ribosomen und Ribonucleinsäuren

wurden daher aus unfractionierten Zellen präpariert. Auch wegen der bekannten Instabilität der Chloroplastenribosomen aus Algen schienen langwierige Auftrennungs- und Reinigungsschritte der Zellfraktionen nicht sinnvoll zu sein.

2. Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Zur Auftrennung der Ribosomen und Ribonucleinsäuren sind vorwiegend exponentielle Saccharosegradienten verwendet worden, bei denen die mit der Entfernung vom Rotationszentrum ansteigende Zuckerviskosität durch die Zentrifugalkraft genau kompensiert wird, so daß die Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit durch den Gradienten laufen (Noll 1967). Im Vergleich mit linearen zeigen diese Gradienten in Verbindung mit einem Rotor mit langen Röhrchen ein deutlich besseres Auflösungsvermögen (vergl. Abb. 8 a und 10 a). Sie sind mit der verwendeten Methode gut reproduzierbar herzustellen, und Unterschiede von 5 s im Fall der Ribosomen und 1 s im Fall der Ribonucleinsäuren können sicher nachgewiesen werden. Ferner erlauben sie es, den Sedimentationskoeffizienten einer unbekannten Substanz direkt aus seiner Sedimentationsgeschwindigkeit zu berechnen, da beide Größen nach Gleichung (4) proportional sind.

Nach Gleichung (1) hängt die Form der exponentiellen Gradienten u. a. von der Dichte der untersuchten Partikel ab. McCarty zeigte im Gegensatz zu Noll, daß die Wahl der richtigen Partikeldichte für die Berechnung der exponentiellen Gradienten wichtig ist (McCarty et al. 1968; Noll 1967). Nun entfalten sich Ribosomen und ribosomale Ribonucleinsäuren in Abhängigkeit bestimmter Ionen, wie etwa Magnesium, verschieden weit und besitzen daher unterschiedliche Dichten und Sedimentationskoeffizienten (Kurland 1960; Taylor et al. 1967). Das Detergens Na-Dodecylsulfat scheint, wie die vorliegende Arbeit zeigt,

ebenfalls einen Einfluß auf die Sedimentationskoeffizienten der Ribonucleinsäuren zu besitzen. Die Sedimentationskoeffizienten einer Substanz lassen sich also nur dann genau berechnen, wenn ihre Dichte unter den verwendeten Ionenbedingungen bekannt ist. Daß trotz dieser Einschränkungen die mit Hilfe der verwendeten Dichtewerte berechneten Gradienten eine annähernd konstante Sedimentationsgeschwindigkeit und die Berechnung von Sedimentationskoeffizienten erlauben, wurde für den Fall von *E. coli*-Ribosomen und Ribonucleinsäuren gezeigt. Auch die Übereinstimmung der Werte für die Sedimentationskoeffizienten der Dunaliella-Ribosomen aus den Berechnungen mit und ohne internen Standard zeigt, daß die Methode zuverlässige Werte liefert.

3. Monosomen aus Dunaliella

Die Ribosomen wurden nicht aus den einzelnen Zellorganellen, sondern aus der Gesamtheit der Zelle präpariert. Da die Chloroplasten durch die Detergensbehandlung vollständig zerstört wurden, sind mindestens zwei Ribosomenpopulationen in den Ribosomenpräparaten zu erwarten, die aus dem Grundplasma und aus den Chloroplasten stammen. Ferner muß man mit der Anwesenheit von Mitochondrienribosomen rechnen. Da sie mengenmäßig jedoch wahrscheinlich kaum ins Gewicht fallen und in vielen Eigenschaften den Chloroplastenribosomen ähneln (Küntzel 1970), wird zwischen diesen beiden Ribosomenpopulationen in den folgenden Ausführungen nicht unterschieden.

a) 80 s Ribosomen

Der größte Teil der bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M aus Dunaliella-Zellen isolierten Ribosomen gehört zur Klasse der 80 s Ribosomen. Mit unterschiedlichen Methoden sind für diese Ribosomen Sedimentationskoeffizienten ermittelt worden, die nur geringfügig um den Wert 80 s schwanken. Sie unterscheiden sich also von denjenigen

aus dem Grundplasma von *Euglena* (Rawson u. Stutz 1968), die deutlich schneller als 80 s sedimentieren.

b) 70 s Ribosomen

Bei der Zentrifugation von Ribosomen aus *Dunaliella* treten weder im Saccharosegradienten noch in der analytischen Ultrazentrifuge 70 s Ribosomen auf. Nur in wenigen Fällen wurde eine Schulter in der 70 s Region der Gradienten festgestellt. Folgende Gründe können das Fehlen der 70 s Ribosomen unter den verwendeten Bedingungen erklären:

(1) Es sind keine Ribosomen in den Chloroplasten und Mitochondrien der Zellen vorhanden. Dagegen sprechen elektronenmikroskopische Aufnahmen, auf denen Chloroplastenribosomen zu erkennen sind (Abb. 1). Aus den relativen Volumina von Grundplasma und Chloroplast und der Dichte der Packung der Ribosomen in beiden Teilen der Zelle läßt sich abschätzen, daß etwa ein Viertel der in der Zelle vorhandenen Ribosomen aus dem Chloroplasten stammt. Diese Abschätzung stimmt gut mit derjenigen an *Chlamydomonas* überein und liegt etwas niedriger als bei höheren Pflanzen (Bruskov u. Odintsova 1968; Lyttleton 1962; Sager u. Hamilton 1967).

(2) Die Chloroplasten der Zelle werden durch die Detergensbehandlung nicht vollständig aufgebrochen, und die Chloroplastenribosomen wandern beim Abzentrifugieren der Grobpartikelfraktion aus dem Zellhomogenat in das Sediment. Dies ist unwahrscheinlich, da das Detergens Triton-X-100 dafür bekannt ist, Chloroplasten völlig aufzulösen (Francki et al. 1965) und da im Zellhomogenat nach der Detergensbehandlung bei mikroskopischer Betrachtung keine chloroplastenähnlichen Strukturen mehr zu erkennen sind.

(3) Das Auflösungsvermögen der verwendeten Gradienten reicht nicht aus, um eine kleine Menge an 70 s Ribosomen neben einer großen an 80 s Ribosomen nachzuweisen. Dafür spricht, daß bei der Zentrifugation von Dunaliella-Ribosomen in einigen Fällen in der 70 s Region des Saccharosegradienten eine Schulter auftritt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde das mit 60 und 70 s sedimentierende Material gesammelt und rezentrifugiert. Trotz der Entfernung des größten Teils der 80 s Ribosomen können auch dann keine 70 s Partikel nachgewiesen werden. Statt dessen enthalten diese Präparate relativ viel 50 s Ribosomen, mehr, als es durch die Verunreinigung der 60 und 70 s Region durch 50 s Ribosomen zu erklären ist.

Diese Ergebnisse legen es nahe anzunehmen, daß 70 s neben 80 s Ribosomen deshalb nicht nachgewiesen werden können, weil sie unter den Isolierungsbedingungen instabil sind und zu 50 s Ribosomen zerfallen. Daß die 50 s Ribosomen kein Abbauprodukt der 80 s Ribosomen sind, zeigt sich bei der Zentrifugation isolierter 80 s Ribosomen und gealterter Ribosomenpräparate.

c) Die Monosomen aus Dunaliella bei unterschiedlichen $K^+ Mg^{2+}$ -Quotienten
Der Versuch, die 70 s Ribosomen aus Dunaliella durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen und niedrige K^+/Mg^{2+} -Quotienten zu stabilisieren, zeigt, daß die 70 s Ribosomen aus Dunaliella deutlich instabiler als diejenigen aus Chlamydomonas sind (Hoover u. Blobel 1969; Sager u. Hamilton 1967). Selbst bei einem K^+/Mg^{2+} -Quotienten von 1 : 1 können keine 70 s Ribosomen in den Präparaten nachgewiesen werden. Erst bei K^+/Mg^{2+} -Quotienten von 0,5 : 1 und einer Mg^{2+} -Konzentration von $4 - 6 \times 10^{-2}$ M taucht 70 s Material in den Ribosomenpräparaten auf. Die Menge an 80 s Ribosomen nimmt allerdings mit der Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration ab.

Diese Ergebnisse können unterschiedlich interpretiert werden. Es liegt nahe anzunehmen, daß die 80 s Ribosomen bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen aggregieren und entweder beim Abzentrifugieren der Grobpartikelfraktion oder bei der Gradientenzentrifugation zum Boden sedimentieren und nicht mehr nachgewiesen werden können. Die Chloroplastenribosomen werden dagegen bei den niedrigen K^+/Mg^{2+} -Quotienten stabilisiert und treten neben den 80 s Ribosomen als Schulter oder distinkter Peak auf. Für diese Argumentation erwartet man folgende experimentelle Bestätigung:

- (1) Die Menge des gesamten ribosomalen Materials, gemessen an der Summe der Flächen unter den Ribosomenpeaks, sollte mit ansteigender Mg^{2+} -Konzentration geringer werden, da ein Teil der 80 s Ribosomen als Aggregate aus den Präparaten entfernt wird.
- (2) Die Menge an 50 s Ribosomen, bei denen es sich wahrscheinlich um Dissoziationsprodukte von 70 s Ribosomen handelt, sollte geringer werden, da die 70 s Ribosomen durch die niedrigen K^+/Mg^{2+} -Quotienten stabilisiert werden,
- (3) Es sollte möglich sein, intakte 70 s Ribosomen aus den Ribosomenpräparaten zu isolieren.

Die Ergebnisse konnten keine dieser Voraussagen bestätigen. Daher ist eher anzunehmen, daß das bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen auftauchende 70 s Material zumindest teilweise aus 80 s Ribosomen entsteht. Dafür spricht auch, daß bei weiterer Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration sowohl die 80 als auch die 70 s Ribosomen verschwinden und ein weniger gut definiertes 60 s Material entsteht.

Da das Verhalten von Ribosomen bei Mg^{2+} -Konzentrationen über 10^{-2} M kaum untersucht wurde, ist ein direkter Vergleich mit Angaben in der

Literatur nicht möglich. Im allgemeinen führen höhere Mg^{2+} -Konzentrationen zur Aggregatbildung der Ribosomen (Tissières et al. 1959; Ts'o et al. 1958). Rattenleberribosomen werden bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 5×10^{-2} M ausgefällt (Takanami 1960). 80 s Ribosomen von *Chlamydomonas* aggregieren dagegen bis zu einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-1} M nicht (Hooper u. Blobel 1969). Interessant im Hinblick auf das Verhalten der 80 s Ribosomen von *Dunaliella* bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen sind die Versuche, die Bayley an dem extrem halophilen Bakterium *Halobacterium cutirubrum* durchgeführt hat (Bayley u. Kushner 1964). Die Ribosomen dieses Organismus liegen bei einer K^+ -Konzentration von 4 M und einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-1} M in Form der 70 s Monosomen vor. Bei Mg^{2+} -Konzentrationen unter 0,1 M und über 0,4 M dissoziieren die Ribosomen. Ob es sich bei dem hier festgestellten Verhalten der *Dunaliella*-Ribosomen bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen ebenfalls um eine Dissoziation handelt, kann nicht entschieden werden.

Bei der Abnahme der Größe der Sedimentationskoeffizienten mit Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration handelt es sich wahrscheinlich weniger um eine spezifische Wirkung der Mg^{2+} -Ionen als um einen unspezifischen Effekt der erhöhten Ionenkonzentration. Auch Zylber konnte an Polysomen und an durch m-RNS geschützten Monosomen nachweisen, daß hohe Salzkonzentrationen die Sedimentationskoeffizienten der Partikel verringern (Zylber u. Penman 1970).

4. Untereinheiten der *Dunaliella*-Ribosomen

a) Die Dissoziation der 80 s Ribosomen und die dabei entstehenden Partikel
Im Unterschied zu 80 s Ribosomen anderer Eukaryonten sind diejenigen von *Dunaliella* durch ihre leichte Dissoziierbarkeit bei Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-3} M charakterisiert:

- (1) In den Ribosomenpräparaten sind bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M ribosomale Untereinheiten vorhanden.
- (2) Isolierte 80 s Ribosomen zerfallen bei dieser Mg^{2+} -Konzentration zu einem Teil in die Untereinheiten.
- (3) Bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-3} M sind praktisch sämtliche 80 s Ribosomen dissoziiert.

Die 80 s Ribosomen von *Dunaliella* ähneln in ihrer ausgeprägten Empfindlichkeit gegen Mg^{2+} -Entzug denjenigen von *Chlamydomonas* (Sager u. Hamilton 1967) und den 70 s Ribosomen von Bakterien. Daß als Dissoziationsprodukte der 80 s Ribosomen von *Dunaliella* 60 und 40 s Partikel auftreten, wurde durch die Isolierung und Rezentrifugation von 80 s Ribosomen bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 4×10^{-2} M gezeigt.

Die schwere Untereinheit

Die bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 3×10^{-3} M mit 60 s sedimentierende schwere Untereinheit der 80 s Ribosomen verringert ihren Sedimentationskoeffizienten bei Senkung der Mg^{2+} -Konzentration über die Stufen 60, 50, 44 s auf 30 s. Es handelt sich hier entweder um eine Abspaltung von Teilen der 60 s Ribosomen oder um eine schrittweise Entfaltung der Partikel, die durch den Mg^{2+} -Entzug hervorgerufen wird. Derartige Entfaltungsphänomene sind zuerst bei den Untereinheiten von *E. coli*-Ribosomen festgestellt und genauer untersucht worden (Gavrilova et al. 1966; Gesteland 1966; Miall u. Walker 1969). Auch für die schwere Untereinheit von 80 s Ribosomen sind solche Vorgänge gezeigt worden. Sie kann bei Mg^{2+} -Entzug in eine entfaltete 50 s Form übergehen (Cross 1970; Ghosh 1969; Morgan 1962; Tashiro u. Yphantis 1965). Ob es sich bei dem Verhalten der 60 s Ribosomen von *Dunaliella* um einen derartigen Entfaltungsprozess handelt, kann nicht entschieden werden, da RNS- und Proteingehalt der bei den unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen auf-

treffenden Partikel nicht bestimmt wurden. Gegen eine Abspaltung von Teilen der 60 s Ribosomen und für eine Konformationsänderung sprechen folgende Hinweise:

(1) Die Menge der in den Ribosomenpräparaten vorhandenen niedermolekularen Bestandteile nimmt nicht zu.

(2) Eine Abspaltung durch RNase-Wirkung ist unwahrscheinlich, weil die Veränderung der 60 s Partikel bei momentaner und langsamer Einstellung der entsprechenden Mg^{2+} -Konzentration in gleicher Weise vor sich geht.

(3) Die Abnahme der Sedimentationskoeffizienten erfolgt sprunghaft, wie es für die Entfaltung von E. coli-Ribosomen beschrieben wurde.

Auffällig ist allerdings, daß die hier geschilderten Prozesse bei Mg^{2+} -Konzentrationen ablaufen, die weit über denjenigen liegen, bei denen bei anderen Objekten Entfaltungsvorgänge gezeigt wurden.

Die leichte Untereinheit

Die leichte Untereinheit der 80 s Ribosomen sedimentiert mit etwa 40 s. Sie ist nur in den Gesamtribosomenpräparaten bei einer Mg^{2+} -Konzentration um 10^{-2} M und darüber oder bei der Rezentrifugation isolierter 80 s Ribosomen bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 4×10^{-2} M nachweisbar. Rezentrifugiert man die 80 s Ribosomen bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen, wird sie sofort weiter zerlegt.

b) Die Dissoziationsprodukte der 70 s Ribosomen

Die schwere Untereinheit

Die Instabilität der 70 s Ribosomen von Dunaliella wurde bereits diskutiert. Verschiedenes spricht dafür, daß die in den Ribosomenpräparaten bei

einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M vorhandene 50 s Komponente die schwere Untereinheit der nicht nachweisbaren 70 s Ribosomen der Chloroplasten ist:

(1) Die Menge der 50 s Ribosomen steht mit derjenigen der Summe der 60 und 80 s Ribosomen in einem festen Verhältnis, das demjenigen entspricht, das man für Ribosomen aus Grundplasma und Chloroplast aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen abschätzen kann.

(2) Bei der Rezentrifugation von Partikeln, die mit etwa 70 s sedimentieren, erhält man neben anderen Komponenten eine relativ große Menge an 50 s Ribosomen.

(3) Die "50 s" Ribosomen von *Dunaliella* sedimentieren etwas langsamer als die schwere Untereinheit von *E. coli*-Ribosomen. Im Vergleich mit ihr muß man ihnen einen Sedimentationskoeffizienten von etwa 46 - 47 s zuschreiben. Ein solches Verhalten ist für die schwere Untereinheit von Chloroplastenribosomen mehrfach festgestellt worden (Hooper u. Blobel 1969; Klopstech, unveröff.).

(4) Bei der Rezentrifugation der 50 s Ribosomen bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M entsteht, wahrscheinlich durch Dimerisierung, eine geringe Menge an 70 s Ribosomen. Eine ähnliche Aggregatbildung wurde an Chloroplastenribosomen aus Spinat festgestellt (Gualerzi u. Cammarano 1969 b).

(5) Aus 50 s Ribosomen läßt sich eine 23 s RNS isolieren.

Die leichte Untereinheit

Die leichte Untereinheit der 70 s Ribosomen scheint wie diejenige der 80 s Ribosomen instabil zu sein. Es ist nicht zu entscheiden, durch

welche Fraktion sie in den Ribosomenpräparaten charakterisiert wird. Es ist möglich, daß sie zusammen mit der leichten Untereinheit der 80 s Ribosomen sedimentiert. Derartige Fälle sind für Chloroplasten- und Mitochondrienribosomen beschrieben worden (Boardman et al. 1966; Hooper u. Blobel 1969; Küntzel 1969). Eine andere Möglichkeit ist die, daß die leichte Untereinheit der Chloroplastenribosomen durch den 30 s Peak repräsentiert wird, der bei der Rezentrifugation der 50 s Ribosomen auftritt. Man muß dann annehmen, daß die 30 s Ribosomen als Trimere im 50 s Peak vorliegen und bei der Rezentrifugation zum Teil mit den 50 s Ribosomen 70 s Monosomen bilden und zum anderen Teil als 30 s Ribosomen sedimentieren.

Die vorliegende Arbeit an *Dunaliella*-Ribosomen zeigt, daß die leichte Untereinheit der 70 und 80 s Ribosomen instabiler als die entsprechenden schweren Untereinheiten ist. Dies stimmt mit Untersuchungen an *E. coli*- (Godson u. Cox 1970) und Reticulocyten-Ribosomen (Cox 1969) überein.

5. Ribonucleinsäuren aus *Dunaliella*

a) Vergleich der RNS aus ganzen Zellen und aus Ribosomen und die chemische Integrität der Ribosomen

Der Vergleich der RNS aus ganzen Zellen mit derjenigen aus in TMK-Puffer isolierten Ribosomen zeigt keine Übereinstimmung der RNS-Muster. Die RNS aus Ribosomen ist gegenüber derjenigen aus ganzen Zellen mehr oder weniger degradiert. Es ist unwahrscheinlich, daß ihr Abbau während ihrer Isolierung aus den Ribosomen eintritt, da sie mit einem potenten RNase-Hemmer mit der gleichen Methode wie aus ganzen Zellen präpariert wird. Man muß daher annehmen, daß die in TMK-Puffer isolierten Ribosomen zwar physikalisch intakt sind, aber eine geschädigte RNS

besitzen. Dies wird dadurch gezeigt, daß es mit Hilfe des RNase-Hemmers Polyvinylsulfat möglich ist, Ribosomen zu präparieren, aus denen sich eine, gemessen an der RNS aus ganzen Zellen, nicht degradierte RNS isolieren läßt. Die zellulären RNasen scheinen also in Abwesenheit eines RNase-Hemmers größere oder kleinere Stücke von den Ribosomen abzuspalten, ohne daß der Sedimentationskoeffizient der Partikel merklich beeinflußt wird; oder sie erzeugen Brüche in der ribosomalen RNS, die solange verborgen bleiben, wie RNS und Protein verbunden sind. Derartige Befunde sind in jüngster Zeit diskutiert worden (Cox 1969; Santer 1963; Szer 1969). Die vorliegenden Resultate zeigen, daß die 26 s RNS nicht in der Mitte zerbrochen, sondern daß ein Stück von ihrem Ende abgespalten wird, wobei ein gut definiertes, mit 24 s sedimentierendes RNS-Molekül entsteht. Die leichte RNS aus *Dunaliella* wird dagegen unregelmäßig zerlegt und kann ganz abgebaut werden. Dies erklärt vielleicht die größere Instabilität der leichten ribosomalen Untereinheiten.

Daß es sich bei der RNS aus *Dunaliella* bis auf die Fraktion, die dicht am Meniskus des Gradienten liegt, um ribosomale RNS handelt, folgt eindeutig daraus, daß die RNS-Muster aus ganzen Zellen und aus mit RNase-Hemmer isolierten Ribosomen identisch sind. Die Tatsache, daß der mit 4 s sedimentierende RNS-Peak bei der Präparation aus ganzen Zellen höher ist als bei der Präparation aus Ribosomen, macht es wahrscheinlich, daß er im Fall der RNS aus ganzen Zellen neben Abbauprodukten lösliche RNS enthält.

b) Die schweren ribosomalen Ribonucleinsäuren

Die in den RNS-Präparaten vorhandene 26 und 23 s RNS steht entweder in einem Vorläufer/Produkt-Verhältnis zueinander, oder es handelt sich um zwei unterschiedliche RNS-Klassen. Daß man bei der Präparation

der Ribonucleinsäuren aus der "80 s Fraktion" der Ribosomenpräparate neben 26 s RNS einen signifikanten Anteil an 23 s RNS erhält, könnte als ein Hinweis darauf aufgefaßt werden, daß die 23 s RNS ein Abbau-produkt der 26 s RNS ist. Folgende Ergebnisse sprechen jedoch dagegen:

(1) Bei der Rezentrifugation von "80 s Ribosomen" entsteht zwischen dem 80 und 60 s Peak ein Plateau, das auf Verunreinigung durch 70 s Material hinweist. Dieses Material könnte die Quelle für die aus 80 s Ribosomen isolierte 23 s RNS sein.

(2) Aus Ribosomenaggregaten erhält man prozentual weniger 23 s RNS als aus 80 s Ribosomen. Will man nicht annehmen, daß die RNS aus 80 s Ribosomen bevorzugt zu 23 s RNS abgebaut wird, dann muß man schließen, daß die Ribosomenaggregate weniger mit 70 s Material ver-unreinigt sind als die 80 s Ribosomen und daher weniger 23 s RNS liefern.

(3) 23 und 26 s RNS sind bei der Präparation aus ganzen Zellen und aus Ribosomen im gleichen Verhältnis vorhanden. Dieses Verhältnis ent-spricht etwa demjenigen von 50 zu 80 s Ribosomen in den Ribosomen-präparaten aus *Dunaliella* und demjenigen von Chloroplasten- zu Cytosol-Ribosomen auf elektronenoptischen Aufnahmen.

(4) Eine Degradation von 26 zu 23 s RNS wurde in keinem Fall beobachtet. Isolierte 26 s RNS wurde unter den Isolierungsbedingungen zwar zu 17,5 s RNS, nicht aber zu 23 s RNS abgebaut. Bei der Präparation von RNS aus "TMK-Ribosomen" entsteht eine 24 s RNS, deren Sedimentations-koeffizient sich signifikant von der 23 s RNS unterscheidet. Durch endogene Degradation wird zuerst die 23 s RNS und dann die 26 s RNS abgebaut.

Bei der 26 s und der 23 s RNS handelt es sich also um zwei unterschied-liche RNS-Klassen. Da sich die 23 s RNS aus den 50 s Ribosomen

isolieren läßt, während die 26 s RNS neben der leichten RNS aus den 80 s Ribosomen stammt, kann man davon ausgehen, daß die 23 s RNS aus den Chloroplasten und die 26 s RNS aus dem Grundplasma der *Dunaliella*-Zellen kommt.

c) Die leichten ribosomalen Ribonucleinsäuren

Als leichte ribosomale Ribonucleinsäure aus *Dunaliella* konnte nur ein Peak nachgewiesen werden, der mit 17,5 s sedimentiert. Durch Isolierung und Rezentrifugation der 26 s und 23 s RNS konnte gezeigt werden, daß dieser Peak geringe Mengen an Abbauprodukten der schweren ribosomalen Ribonucleinsäuren enthält. Derartige Abbauerscheinungen wurden auch von anderen Autoren diskutiert (Huppert u. Pelmont 1962; Midgley 1965).

Daß mit Hilfe der Technik der Saccharosegradientenzentrifugation nur eine leichte ribosomale RNS aus *Dunaliella* nachgewiesen werden kann, widerspricht den Resultaten, die an anderen Objekten mit der gleichen Technik erhalten wurden, nicht (Click u. Tint 1967; Küntzel u. Noll 1967; Noll 1967). Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnten dagegen die leichten Ribonucleinsäuren aus dem Cytosol und den Chloroplasten von Pflanzen voneinander getrennt werden (Loening u. Ingle 1967). Die Ursache für die unterschiedlichen Resultate in bezug auf die leichten pflanzlichen Ribonucleinsäuren ist unklar. Daß das Auflösungsvermögen der Saccharosegradienten nicht ausreicht, um die 18 s RNS aus dem Grundplasma von Pflanzen von der 16 s RNS aus Chloroplasten oder *E. coli* zu trennen, ist deshalb unwahrscheinlich, weil die 18 s RNS aus tierischen Geweben leicht im Gradienten von bakterieller 16 s RNS abgetrennt werden kann (Click u. Tint 1967; Noll 1967). Es muß daher daran gedacht werden, daß sich die leichten ribosomalen Ribonucleinsäuren aus dem pflanzlichen Grundplasma und den Chloroplasten zwar in ihren Molekulargewichten, aber nicht in ihren Sedimentationskoeffizienten voneinander unterscheiden.

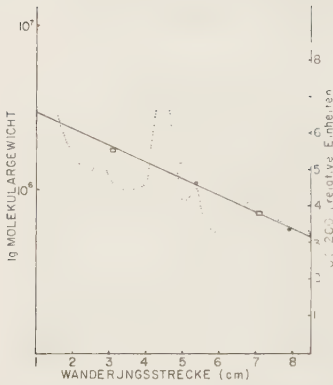


Abb. 23

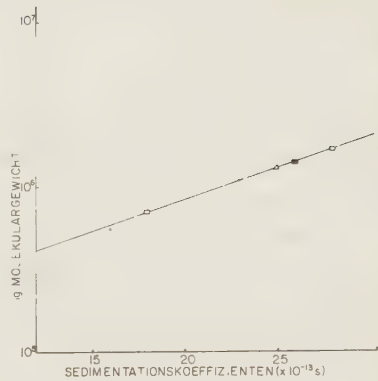


Abb. 24

Abbildung 23: Elektrophoretische Auftrennung von Dunaliella-RNS aus ganzen Zellen (Reuter, unveröff.).

..... Optische Dichte der Dunaliella-RNS bei 260 mμ.
 ————— Eichkurve mit Leber- (□) und E. coli-RNS (o).

Abbildung 24: Abhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten von Ribonucleinsäuren vom Logarithmus ihrer Molekulargewichte.

- o RNS aus E. coli
- Δ RNS aus dem Grundplasma von Pflanzen
- RNS aus Rattenleber
- RNS aus Arbacia

Daten nach Loening (1968) und Sy u. McCarty (1968).

Tabelle 6:

Material	"16 s"	"18 s"	"23 s"	"25 s"	"28 s"
Dunaliella ^a	0, 500 (14, 2 s)	0, 66 (17, 4 s)	1, 07 (23 s)	1, 30 (25 s)	2, 02 (30, 3 s)
E. coli ^b	0, 56 (16 s)		1, 07 (23 s)		
Grundplasma ^b v. Pflanzen		0, 70 (? s)		1, 30 (25 s)	
Leber ^b		0, 70 (18 s)			1, 75 (28 s)

Molekulargewichte ($\times 10^6$ Daltons) und Sedimentationskoeffizienten ($\times 10^{-13}$ s) der ribosomalen Ribonucleinsäuren einiger Organismen.

a: Die Sedimentationskoeffizienten wurden aus den Molekulargewichten geschätzt.

b: Daten aus: Loening 1968.

Um diese Fragen genauer zu prüfen, wurde die Dunaliella-RNS in der Elektrophorese getestet (Reuter, unveröff.). Es wurde im wesentlichen mit der von Loening angegebenen Methode (Loening 1968; Loening u. Ingle 1967) gearbeitet, die Trennung erfolgte aber horizontal auf Objektträgern, auf die das Gel geschichtet war. Die im Isolierungspuffer gelösten RNS-Proben wurden etwa 1 : 1 mit Elektrophoresepuffer ($3,75 \times 10^{-2}$ M Tris/HCl, pH 7,3) verdünnt und 1 μ g pro Lauf untersucht. Die Methode wurde mit E. coli- und Rattenleber-RNS standardisiert (Abb. 23). Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte nach den Angaben von Loening. Nach der Aufstellung einer Eichkurve (Abb. 24) wurden die Sedimentationskoeffizienten der Dunaliella-RNS aus ihren Molekulargewichten geschätzt.

Das Profil der Dunaliella-RNS in der Elektrophorese (Abb. 23) zeigt, daß 26 s und 23 s RNS ähnlich wie im Saccharosegradienten laufen und die aus den Molekulargewichten geschätzten Sedimentationskoeffizienten mit den aus den Gradienten berechneten übereinstimmen. Daneben findet man in der Elektrophorese noch schwereres Material mit einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 30 s, das im Saccharosegradienten nicht nachzuweisen ist. Interessant ist das Verhalten der leichten Dunaliella-RNS (Tab. 6). Während sie im Saccharosegradienten kaum von der leichten E. coli-RNS abgetrennt werden kann (17,5 s, wenn die E. coli-RNS mit 16,8 s sedimentiert, entsprechend 16,6 s, wenn die E. coli-RNS mit 16,0 s sedimentiert), findet man in der Elektrophorese eine deutliche Trennung von Dunaliella- und E. coli-RNS (17,4 s, wenn die E. coli-RNS mit 16,0 s sedimentiert). Da in beiden Fällen die gleichen RNS-Präparate untersucht wurden, kann dies nichts anderes bedeuten, als daß die pflanzliche RNS in der Elektrophorese nach anderen Eigenschaften als im Saccharosegradienten aufgetrennt wird.

Da das aus der Elektrophorese berechnete Molekulargewicht der leichten Dunaliella-RNS dicht bei dem Wert, der für die leichte RNS aus dem Cytoplasma von Pflanzen angegeben wird, liegt (Tab. 6), ist es wahrscheinlich, daß es sich hier um die leichte RNS aus dem Grundplasma handelt. Daneben taucht in der Elektrophorese Material mit einem Molekulargewicht von etwa $0,5 \times 10^6$ Daltons entsprechend einem Sedimentationskoeffizienten von 14,2 s auf. Durch Versuche, bei denen die 17,5 s RNS aus Saccharosegradienten isoliert und in der Elektrophorese getestet wurde, ergibt sich, daß der 14,2 s Peak aus dem 17,5 s Peak stammt. Ob es sich hier um ein Abbauprodukt der 17,5 s RNS oder um die leichte RNS aus den Chloroplasten von Dunaliella handelt, kann nicht entschieden werden.

6. Schlußfolgerungen

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß Dunaliella in ihrer Ribosomen- und Ribonucleinsäureausstattung auch höheren Pflanzen in vielen Punkten ähnelt. Die Sedimentationskoeffizienten der Ribosomen und Ribonucleinsäuren stimmen mit denjenigen höherer Pflanzen überein. Dies zeigt, daß es im Pflanzenreich im Unterschied zum Tierreich nicht zu einer Vergrößerung der Ribonucleinsäuremoleküle im Zuge der Evolution gekommen ist (Loening 1968).

Auffällig ist die große Empfindlichkeit der Dunaliella-Ribosomen gegen Mg^{2+} -Entzug. Die Chloroplastenribosomen sind als Monosomen unter den verwendeten Bedingungen überhaupt nicht nachweisbar, und selbst die 80 s Ribosomen zerfallen bei Mg^{2+} -Konzentrationen, bei denen diejenigen höherer Pflanzen noch stabil sind. Die Instabilität ihrer Chloroplastenribosomen scheint für Algen charakteristisch zu sein und steht im Gegensatz zum Verhalten der Chloroplastenribosomen höherer Pflanzen. Das Verhalten der 80 s Ribosomen scheint dagegen auch bei

Tabelle 7:

		Mg^{2+} -Konzentration in mM	
(1)	70 s Rib. aus Algenchloropl.		über 10
(2) *	70 s Rib. von Bakterien höherer Pflanzen	80 s Ribos. v. Chlamydomonas Dunaliella Crithidia	5 - 10
(3)		*80 s Ribos. v. Hefe Neurospora	1 - 2
(4)		*80 s Ribos. v. Rattenleber Jensen Sarcoma Pisum sativum	0, 5

Minimale Mg^{2+} -Konzentration für die Stabilität von Ribosomen.

* Nach Hsiao 1964.

Algen nicht der Regel zu entsprechen (Rodriguez-Lopez u. Vazquez 1968). Hier ähnelt *Dunaliella* dem nahe verwandten Flagellaten *Chlamydomonas* und dem trypanosomaartigen Flagellaten *Crithidia*. Es folgt, daß eine allgemeine Charakterisierung der 80 s Ribosomen von Eukaryonten als unempfindlich gegen Mg^{2+} -Entzug nicht haltbar ist.

Die biologische Bedeutung der unterschiedlichen Abhängigkeit der Ribosomen verschiedener Organismen von der Mg^{2+} -Konzentration ist schwer zu übersehen. Hsiao hat angenommen, daß die Unempfindlichkeit der Ribosomen gegen Mg^{2+} -Entzug mit steigender Komplexität der Organismen zunimmt (Hsiao 1964). Diese Vorstellung wird durch die Resultate der vorliegenden Arbeit und andere Angaben in der Literatur bestätigt. Die in Tabelle 7 angeführten Daten stehen im Einklang mit der Annahme, daß es sowohl innerhalb der Chloroplastenribosomen als auch der 80 s Ribosomen von Eukaryonten zu einer Abnahme ihres Mg^{2+} -Bedarfs im Laufe der Evolution gekommen ist.

Ferner ist es möglich, daß die Mg^{2+} -Konzentrationen, bei denen Ribosomen dissoziieren, in einem Zusammenhang mit den in den betreffenden Organismen vorhandenen Mg^{2+} -Ionenaktivitäten stehen. Ein Beispiel dafür ist das extrem halophile Bakterium *Halobacterium cutirubrum* (Bayley u. Kushner 1964), das, wie oben erwähnt, in seinem Cytoplasma eine K^+ -Konzentration von 4 M und eine Mg^{2+} -Konzentration von etwa 0,1 M besitzt. Bei diesen Salzkonzentrationen liegen die Ribosomen dieses Organismus in Form der Monosomen vor, bei etwas niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen dissoziieren sie. Ähnliche Bedingungen scheinen bei *E. coli* zu existieren. Die Mg^{2+} -Ionenaktivität in den Zellen dieses Bakteriums liegt etwa bei 10^{-3} M (Günther u. Dorn 1969), eine Konzentration, bei der die Dissoziation der Ribosomen in die Untereinheiten beginnt. Die Dissoziation von 80 s Ribosomen tierischer Zellen

in vitro läuft dagegen bei Mg^{2+} -Konzentrationen ab, die weit unter den in vivo Verhältnissen liegen, denn die Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen tierischer Zellen liegen mit Werten von etwa 2×10^{-3} M Mg^{2+} nicht niedriger als diejenigen von Bakterienzellen (Günther 1967; Nanninga 1961; Thiers u. Vallee 1957). Eine genauere Analyse dieser Zusammenhänge ist leider nicht möglich, da die intrazelluläre Mg^{2+} -Ionenaktivität der meisten Organismen unbekannt ist. Ferner müssen eine eventuell ungleichmäßige Verteilung des Magnesiums im Cytoplasma und die im Cytoplasma vorhandenen Kalium- und Polyamin-Konzentrationen berücksichtigt werden. Aufschlußreich wäre eine Analyse der Ionenverhältnisse in *Dunaliella*. Sie würde die Frage beantworten, ob die Empfindlichkeit der Ribosomen dieses Flagellaten gegen Mg^{2+} -Entzug ähnlich wie bei *Halobakterium* auf seine starke Halophilie und damit verbundene hohe Ionenkonzentrationen im Cytoplasma zurückzuführen ist.

Ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Mg^{2+} -Ionenaktivität der Organismen und derjenigen, bei der ihre Ribosomen dissoziieren, ist im Hinblick auf die Proteinsynthese interessant. Man nimmt heute an, daß zur Initiation der Translation die freien Untereinheiten der Ribosomen vorhanden sein müssen (Bishop 1966; Kaempfer et al. 1968). Nach Spirin kommt es sogar nach jeder Knüpfung einer Peptidbindung zu einem geringfügigen Auseinanderweichen der beiden Ribosomenuntereinheiten (Spirin 1968). Er nimmt an, daß die Ribosomen an die im Organismus herrschenden Ionenkonzentrationen derartig angepaßt sein müssen, daß sie unter diesen Bedingungen an der Grenze ihrer Stabilität liegen. Während dies, wie oben gezeigt wurde, bei bakteriellen Systemen der Fall zu sein scheint, trifft es für den größten Teil der eukaryontischen Systeme wahrscheinlich nicht zu. Weiter muß man berücksichtigen, daß die Proteinsynthese in vitro sowohl im bakteriellen

als auch im eukaryontischen System optimal bei Mg^{2+} -Konzentrationen abläuft, die um ein bis zwei Zehnerpotenzen über denjenigen liegen, bei denen die Dissoziation der Ribosomen beginnt (Boardman et al. 1966; Lamfrom u. Knopf 1964; Tissières et al. 1960). Der Nachweis von Dissoziationsfaktoren bei Bakterienribosomen (Bade et al. 1969; Subramanian et al. 1968) weist allerdings darauf hin, daß es nicht nur die Mg^{2+} -Ionenaktivität ist, die für die Dissoziation der Ribosomen während der Proteinsynthese verantwortlich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Ribosomen und ribosomalen Ribonucleinsäuren des zu den Volvocalen gehörenden Flagellaten *Dunaliella spec.* wurden isoliert und mit unterschiedlichen Methoden charakterisiert.
2. Bei 10^{-2} M MgCl_2 , 6×10^{-2} M KCl und 10^{-2} M Tris/HCl, pH 7,8, sind im Zellhomogenat vorwiegend 80 und 50 s Ribosomen vorhanden. Das Mengenverhältnis der beiden Ribosomenklassen ist konstant, etwa 75 % der Ribosomen gehören zur Klasse der 80 s Ribosomen. Dieses Verhältnis entspricht etwa demjenigen, das man aus elektronenoptischen Aufnahmen für Ribosomen aus dem Grundplasma und aus den Chloroplasten abschätzen kann.
3. Die 80 s Ribosomen von *Dunaliella* sind bei Mg^{2+} -Konzentrationen unter 10^{-2} M instabil.
4. Die schwere Untereinheit der 80 s Ribosomen sedimentiert mit etwa 60 s. Bei Senkung der Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M auf 10^{-4} M verringert sich ihr Sedimentationskoeffizient über die Stufen 60 und 50 s auf 44 s. In 0,01 M Phosphatpuffer entsteht eine 30 s Komponente. Die diskontinuierliche Abnahme des Sedimentationskoeffizienten der 60 s Untereinheit mit Senkung der Mg^{2+} -Konzentration wird im Sinne eines Entfaltungsvorganges diskutiert.
5. Die leichte Untereinheit der 80 s Ribosomen tritt bei der Spaltung von 80 s Ribosomen durch Mg^{2+} -Konzentrationen unter 10^{-2} M nicht auf. Sie läßt sich nur im Zellhomogenat bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 10^{-2} M und darüber oder bei der Zentrifugation isolierter 80 s Ribosomen im Saccharosegradienten bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen (4×10^{-2} M) nachweisen. Sie sedimentiert mit etwa 40 s.

6. 70 s Ribosomen lassen sich unter den geprüften Bedingungen nicht isolieren. Bei niedrigen K^+/Mg^{2+} -Quotienten ($4 - 6 \times 10^{-2}$ M $MgCl_2$, $2,5 \times 10^{-2}$ M KCl, $2,5 \times 10^{-2}$ M Tris) tritt zwar 70 s Material im Zellhomogenat auf, aber es scheint fraglich zu sein, ob es sich dabei um native 70 s Ribosomen handelt.

7. Statt der 70 s Ribosomen findet sich im Zellhomogenat die 50 s Untereinheit.

8. Bei der Zentrifugation isolierter 50 s Ribosomen im Saccharose-gradienten findet man neben einem Hauptanteil an 50 s Ribosomen kleinere Mengen an 70 und 30 s Ribosomen. Es wird diskutiert, ob es sich bei den 30 s Ribosomen um die leichte Untereinheit der 70 s Ribosomen handelt.

9. Aus *Dunaliella*-Zellen und aus *Dunaliella*-Ribosomen lassen sich mehrere Ribonucleinsäureklassen isolieren, die mit 26 s, 23 s, 17,5 s und 4 s sedimentieren. Die Ribonucleinsäuremuster aus ganzen Zellen und aus Ribosomen sind nur dann identisch, wenn die Ribosomen in Gegenwart eines RNase-Hemmers präpariert werden.

10. Aus der 80 s Ribosomenfraktion läßt sich neben 23 s RNS eine 26 s und eine 17,5 s RNS isolieren, aus der 50 s Ribosomenfraktion eine 23 s RNS.

11. Die biologische Bedeutung der Empfindlichkeit der 80 s Ribosomen gegen Mg^{2+} -Entzug wird diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

Arnon, D. J. , 1949:

"Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*".

Plant Physiol. 24, 1-15.

Bade, E. G. , González, N. S. , und Algranati, I. D. , 1969:

"Dissociation of 70 S ribosomes: Some properties of the dissociating factor from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*".

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 64, 654-660.

Bayley, S. T. , und Kushner, D. J. , 1964:

"The ribosomes of the extremely halophilic bacterium, *Halobacterium cutirubrum*".

J. Mol. Biol. 9, 654-669.

Bishop, D. H. L. , Claybrook, J. R. , und Spiegelman, S. , 1967:

"Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels".

J. Mol. Biol. 26, 373-387.

Bishop, J. O. , 1966:

"Initiation of haemoglobin polypeptide chains".

Biochim. Biophys. Acta 119, 130-145.

Biswas, B. B. , 1969:

"Ribosomes in cotyledons of mungbean seeds at different stages of germination".

Archives Biochem. Biophys. 132, 198-204.

Biswas, S. , und Biswas, B.B. , 1965:

"Effect of polyribonucleotides on amino acid incorporation by chloroplast ribosomes".

Experientia 21, 251-253.

Biswas, S. , Mandal, R. K. , und Biswas, B.B. , 1969:

"Ribosomal proteins and ribonucleic acids from chloroplasts".

Exp. Cell Res. 54, 129-132.

Boardman, N.K. , Francki, R.I.B. , und Wildman, S.G. , 1966:

"Protein synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves.

III. Comparision of the physical properties and protein synthesizing activities of 70 s chloroplast and 80 s cytoplasmic ribosomes".

J. Mol. Biol. 17, 470-489.

Bonanou, S. , Cox, R.A. , Higginson, B. , und Kanagalingam, K. , 1968:

"The production of biologically active subparticles from rabbit reticulocyte ribosomes".

Biochem. J. 110, 87-98.

Bruskov, V.I. , und Odintsova, M. S. , 1968:

"Comparative electron microscopic studies of chloroplast and cytoplasmic ribosomes".

J. Mol. Biol. 32, 471-473.

Chao, F. -C. , 1957:

"Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast".

Archivs Biochem. Biophys. 70, 426-431.

Chen, J. L. , und Wildman, S. G. , 1970:

" "Free" and membrane-bound ribosomes, and nature of products formed by isolated tobacco chloroplasts incubated for protein synthesis".

Biochim. Biophys. Acta 209, 207-219.

Choi, Y. S. , und Carr, C. W. , 1967:

"Ion-binding studies of ribonucleic acid and *Escherichia coli* ribosomes".

J. Mol. Biol. 25, 331-345.

Click, R. E. , und Tint, B. L. , 1967:

"Comparative sedimentation rates of plant, bacterial and animal ribosomal RNA".

J. Mol. Biol. 25, 111-122.

Cox, R. A. , 1969:

"The effect of pancreatic ribonuclease on rabbit reticulocyte ribosomes and its interpretation in terms of ribosome structure".

Biochem. J. 114, 753-767.

Cross, G. A. M. , 1970:

"Sedimentation properties of polyribosomes, ribosomes and ribosomal subunits from *Crithidia oncopelti*".

Biochim. Biophys. Acta 204, 470-477.

Francki, R. I. B. , Boardman, N. K. , und Wildman, S. G. , 1965:

"Protein synthesis by cell-free extracts from tobacco leaves.

I. Amino acid incorporating activity of chloroplasts in relation to their structure".

Biochemistry 4, 865-872.

Galling, G. , 1968:

"Über Polyribosomenpräparationen aus *Chlorella pyrenoidosa*".

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 81, 349-358.

Galling, G. , 1970:

"Ribosomes in unicellular green algae. I. On the cytoplasmic monosomes of *Chlorella*".

Cytobiologie 1, 304-315.

Gavrilova, L. P. , Ivanov, D. A. , und Spirin, A. S. , 1966:

"Studies on the structure of ribosomes. III. Stepwise unfolding of the 50 s particles without loss of ribosomal protein".

J. Mol. Biol. 16, 473-489.

Gesteland, R. F. , 1966:

"Unfolding of Escherichia coli ribosomes by removal of magnesium".

J. Mol. Biol. 18, 356-371.

Ghosh, N. , 1969:

"Studies on the conversion of 60 s yeast ribosomes into a 50 s component".

Biochem. J. 115, 1005-1007.

Godson, G. N. , und Cox, R. A. , 1970:

"Structure of Escherichia coli ribosomes: Effect of ribonuclease on the 30-S and 50-S subunits".

Biochim. Biophys. Acta 204, 489-501.

Goldberg, A. , 1966:

"Magnesium binding by Escherichia coli ribosomes".

J. Mol. Biol. 15, 663-673.

Gould, H. J. , Arnstein, H. R. V. , und Cox, R. A. , 1966:

"The dissociation of reticulocyte polysomes into subunits and the location of messenger RNA".

J. Mol. Biol. 15, 600-618.

Gualerzi, C. , und Cammarano, P. , 1969 a:

"Comparative electrophoretic studies on the protein of chloroplast and cytoplasmic ribosomes of spinach leaves".

Biochim. Biophys. Acta 190, 170-186.

Gualerzi, C. , und Cammarano, P. , 1969 b:

"Formation of aggregates of the small subunits of chloroplast ribosomes".

Biochim. Biophys. Acta 190, 551-553.

Gualerzi, C. , und Cammarano, P. , 1970:

"Species specificity of ribosomal proteins from chloroplast and cytoplasmic ribosomes of higher plants. Electrophoretic studies".

Biochim. Biophys. Acta 199, 203-213.

Günther, Th. , 1967:

"Die intrazelluläre Mg-Ionenkonzentration".

Z. Naturforsch. 22b, 149-154.

Günther, Th. , und Dorn, F. , 1969:

"Über die intrazelluläre Mg-Ionenaktivität von E. coli-Zellen".

Z. Naturforsch. 24b, 713-717.

Hadziyev, D. , und Zalik, S. , 1970:

"Amino acid incorporation by ribosomes and polyribosomes from wheat chloroplasts".

Biochem. J. 116, 111-124.

Hall, C. E. , und Slayter, H. S. , 1959:

"Electron microscopy of ribonucleoprotein particles from E. coli".

J. Mol. Biol. 1, 329-332.

Hamburger, C. , 1905:

"Zur Kenntnis der Dunaliella salina und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari".

Arch. für Protistenkunde 6, 111-130.

Hamilton, M. G. , und Ruth, M. E. , 1967:

"Characterization of some of the proteins of the large subunit of rat liver ribosomes".

Biochemistry 6, 2585-2591.

Henshaw, E. C. , 1964:

"Subunits of rat liver ribosomes".

J. Mol. Biol. 9, 610-612.

Hersh, R. T. , und Phillips, M. , 1964:

"Primary dissociation products of the 80-S ribosome from little marvel peas".

Biochim. Biophys. Acta 87, 351-353.

Hoover, J. K. , und Blobel, G. , 1969:

"Characterization of chloroplastic and cytoplasmic ribosomes of Chlamydomonas reinhardi".

J. Mol. Biol. 41, 121-138.

Hsiao, T. C. , 1964:

"Characteristics of ribosomes isolated from roots of Zea mays".

Biochim. Biophys. Acta 91, 598-605.

Huppert, J. , und Pelmont, J. , 1962:

"Ultracentrifuge studies of RNA degradation".

Archives Biochem. Biophys. 98, 214-223.

Huxley, H. E. , und Zubay, G. , 1960:

"Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from Escherichia coli".

J. Mol. Biol. 2, 10-18.

Jacob, F. , und Monod, J. , 1961:

"Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins".

J. Mol. Biol. 3, 318-356.

Janda, H. -G. , und Wittmann, H. G. , 1968:

"Ribosomal proteins. V. Comparision of protein patterns of 70 s and 80 s ribosomes from various plants by polyacrylamide gel electrophoresis".

Molec. Gen. Genetics 103, 238-243.

Janowski, M. , Bonotto, S. , und Boloukhère, M. , 1969:

"Ribosomes of *Acetabularia mediterranea*".

Biochim. Biophys. Acta 174, 525-535.

Kaempfer, R. O. R. , Meselson, M. , und Raskas, H. J. , 1968:

"Cyclic dissociation into stable subunits and re-formation of ribosomes during bacterial growth".

J. Mol. Biol. 31, 277-289.

Küntzel, H. , 1969:

"Mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Neurospora crassa*: Characterization of their subunits".

J. Mol. Biol. 40, 315-320.

Küntzel, H. , 1970:

"The genetic apparatus of mitochondria".

Im Druck.

Küntzel, H. , und Noll, H. , 1967:

"Mitochondrial and cytoplasmic polysomes from *Neurospora crassa*".

Nature 215, 1340-1345.

Kurland, C. G. , 1960:

"Molecular characterization of ribonucleic acid from *Escherichia coli* ribosomes. I. Isolation and molecular weights".

J. Mol. Biol. 2, 83-91.

Labbé, M. A. , 1921:

"Sur les modifications adaptives de *Dunaliella salina* Dunal".

C. R. Acad. Sci. 172, 1074-1076.

Lamfrom, H. , und Glowacki, E. R. , 1962:

"Controlled dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes and its effect on hemoglobin synthesis".

J. Mol. Biol. 5, 97-108.

Lamfrom, H. , und Knopf, P. M. , 1964:

"Initiation of haemoglobin synthesis in cell-free systems".

J. Mol. Biol. 9, 558-575.

Leick, V. , und Plesner, P. , 1968:

"Formation of ribosomes in *Tetrahymena pyriformis*".

Biochim. Biophys. Acta 169, 398-408.

Lerche, W. , 1937:

"Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*".

Arch. für Protistenkunde LXXXVIII, 236-268.

Linskens, H. F. , 1969:

"Changes in the polysomal pattern after fertilization in *Fucus* eggs".

Planta 85, 175-182.

Loening, U. E. , 1968:

"Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution".

J. Mol. Biol. 38, 355-365.

Loening, U. E. , und Ingle, J. , 1967:

"Diversity of RNA components in green plant tissues".

Nature 215, 363-367.

Low, R. B. , und Wool, I. G. , 1967:

"Mammalian ribosomal protein: Analysis by electrophoresis on polyacrylamide gel".

Science 155, 330-332.

Lowry, O. H. , Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. , und Randall, R. J. ,
1951:

"Protein measurement with the folin phenol reagent".

J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lyttleton, J. W. , 1962:

"Isolation of ribosomes from spinach chloroplasts".

Exp. Cell Res. 26, 312-317.

Lyttleton, J. W. , 1968:

"Protein constituents of plant ribosomes".

Biochim. Biophys. Acta 154, 145-149.

Martin, R. G. , und Ames, B. N. , 1961:

"A method for determining the sedimentation behavior of enzymes:
Application to protein mixtures".

J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.

- Martin, T. E. , Rolleston, F. S. , Low, R. B. , und Wool, I. G. , 1969:
"Dissociation and reassociation of skeletal muscle ribosomes".
J. Mol. Biol. 43, 135-149.
- Mathias, A. P. , und Williamson, R. , 1964:
"Studies on the protein of rabbit reticulocyte ribosomes".
J. Mol. Biol. 9, 498-502.
- McCarty, K. S. , Stafford, D. , und Brown, O. , 1968:
"Resolution and fractionation of macromolecules by isokinetic sucrose density gradient sedimentation".
Anal. Bioch. 24, 314-329.
- McLachlan, J. , und Yentsch, C. S. , 1959:
"Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture".
Biological Bulletin 116, 461-471.
- Meselson, M. , Nomura, M. , Brenner, S. , Davern, C. , und Schlessinger, D. , 1964:
"Conservation of ribosomes during bacterial growth".
J. Mol. Biol. 9, 696-711.
- Miall, S. H. , und Walker, I. O. , 1969:
"Structural studies on ribosomes. II. Denaturation and sedimentation of ribosomal subunits unfolded in EDTA".
Biochim. Biophys. Acta 174, 551-560.
- Midgley, J. E. M. , 1965:
"Studies on the structure of 23-S ribosomal ribonucleic acid from *Escherichia coli*".
Biochim. Biophys. Acta 108, 348-354.

Moore, P.B. , Traut, R.R. , Noller, H. , Pearson, P. , und
Delius, H. , 1968:

"Ribosomal proteins of Escherichia coli. II. Proteins from the
30 S subunit".

J. Mol. Biol. 31, 441-461.

Morgan, R. S. , 1962:

"A new form of ribosome from yeast".

J. Mol. Biol. 4, 115-117.

Nanninga, L. B. , 1961:

"Calculation of free magnesium, calcium and potassium in muscle".

Biochim. Biophys. Acta 54, 338-344.

Nolan, R. D. , und Arnstein, H. R. V. , 1969:

"The dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes into subparticles
active in protein synthesis".

European J. Biochem. 10, 96-101.

Noll, H. , 1967:

"Characterization of macromolecules by constant velocity sedimentation".

Nature 215, 360-363.

O'Brien, T. W. , und Kalf, G. F. , 1967:

"Ribosomes from rat liver mitochondria. II. Partial characterization".

J. Biol. Chem. 242, 2180-2185.

Odintsova, M. S. , Bruskov, V. I. , und Golubeva, E. V. , 1967:

"Comparative study on ribosome of chloroplasts and cytoplasm of
some plants".

Biochimija 32, 1047-1059.

Oppenheim, J. , Scheinbuks, J. , Biava, C. , und Marcus, L. , 1968:
"Polyribosomes in *Azotobacter vinelandii*. I. Isolation, characterization
and distribution of ribosomes, polyribosomes and subunits in
logarithmically growing *Azotobacter*".
Biochim. Biophys. Acta 161, 386-401.

Perry, R. P. , und Kelley, D. E. , 1966:
"Buoyant densities of cytoplasmic ribonucleoprotein particles of
mammalian cells: Distinctive character of ribosome subunits and the
rapidly labeled components".
J. Mol. Biol. 16, 255-268.

Petermann, M. L. , 1960:
"Ribonucleoprotein from a rat tumor, the Jensen Sarcoma.
I. The effect of magnesium binding on ultracentrifugal and
electrophoretic properties".
J. Biol. Chem. 235, 1998-2003.

Petermann, M. L. , 1964:
"The physical and chemical properties of ribosomes".
Elsevier Publishing Company Amsterdam/London/New York.

Petermann, M. L. , und Pavlovec, A. , 1966:
"The subunits and structural ribonucleic acids of Jensen Sarcoma
ribosomes".
Biochim. Biophys. Acta 114, 264-276.

Pogo, A. O. , Pogo, B. G. T. , Littau, V. C. , Allfrey, V. G. ,
Mirsky, A. E. , und Hamilton, M. G. , 1962:
"The purification and properties of ribosomes from the thymus nucleus".
Biochim. Biophys. Acta 55, 849-864.

Ralph, R. K. , und Bellamy, A. R. . 1964:

"Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids".

Biochim. Biophys. Acta 87, 9-16.

Rawson, J. R. , und Stutz, E. , 1968:

"Characterization of *Euglena* cytoplasmic ribosomes and ribosomal RNA by zone velocity sedimentation in sucrose gradients".

J. Mol. Biol. 33, 309-314.

Rawson, J. R. , und Stutz, E. , 1969:

"Isolation and characterization of *Euglena gracilis* cytoplasmic and chloroplast ribosomes and their ribosomal RNA components".

Biochim. Biophys. Acta 190, 368-380.

Rodriguez-Lopez, M. , und Vazquez, D. , 1968:

"Comparative studies on cytoplasmic ribosomes from algae".

Life Sciences 7, 327-336.

Ruppel, H. G. , 1968:

"Nucleinsäuren in Chloroplasten. II. Isolierung und Charakterisierung der Chloroplastenribosomen von *Antirrhinum majus*".

Z. Naturforsch. 23b, 997-1004.

Sager, R. , und Hamilton, M. G. , 1967:

"Cytoplasmic and chloroplast ribosomes of *Chlamydomonas*:

Ultracentrifugal characterization".

Science 157, 709-711.

Santer, M. , 1963:

"Ribosomal RNA on the surface of ribosomes".

Science 141, 1049-1050.

Schweiger, H. G. , 1969:

"Cell biology of Acetabularia".

Current Topics in Microbiology and Immunology 50, 1-31.

Schweiger, H. G. , 1970:

"Synthesis of RNA in Acetabularia".

Symposia of the Society for Experimental Biology XXIV, 327-344.

Shelton, E. , und Kuff, E. L. , 1966:

"Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells".

J. Mol. Biol. 22, 23-31.

Spencer, D. , 1965:

"Protein synthesis by isolated spinach chloroplasts".

Archives Biochem. Biophys. 111, 381-390.

Spirin, A. S. , 1968:

"How does the ribosome work? A hypothesis based on the two subunit construction of the ribosome".

Currents in Modern Biology 2, 115-127.

Spirin, A. S. , 1969:

"Structure of the ribosome".

Progress in Biophysics and Molecular Biology 19, 135-174.

Spirin, A. S. , und Gavrilova, L. P. , 1969:

"The ribosome".

Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 4.

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Stanley Jr., W. M., und Bock, R. M., 1965:

"Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of *Escherichia coli*".

Biochemistry 4, 1302-1311.

Stegeman, W. J., Cooper, C. S., und Avers, C. J., 1970:

"Physical characterization of ribosomes from purified mitochondria of yeast".

Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 69-76.

Studier, F. W., 1965:

"Sedimentation studies of the size and shape of DNA".

J. Mol. Biol. 11, 373-390.

Stutz, F., und Noll, H., 1967:

"Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants: Evidence for three classes of ribosomal RNA in Nature".

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 57, 774-781.

Subramanian, A. R., Ron, E. Z., und Davis, B. D., 1968:

"A factor required for ribosome dissociation in *Escherichia coli*".

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 61, 761-767.

Svetailo, E. N., Philippovich, I. I., and the late Sissakian, N. M., 1967:

"Differences in sedimentation properties of chloroplast and cytoplasmic ribosomes from pea seedlings".

J. Mol. Biol. 24, 405-415.

Swanson, R. F., und Dawid, I. B., 1970:

"The mitochondrial ribosome of *Xenopus laevis*".

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 66, 117-124.

Sy, J. , und McCarty, K. S. , 1968:

"Ribosomal RNA of *Arbacia punctulata*".

Biochim. Biophys. Acta 166, 571-574.

Szer, W. , 1969:

"Enzymatic degradation of ribosomal RNA in isolated purified ribosomes".

Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 653-658.

Takanami, M. , 1960:

"A stable ribonucleoprotein for amino acid incorporation".

Biochim. Biophys. Acta 39, 318-326.

Tashiro, Y. , und Yphantis, D.A. , 1965:

"Molecular weights of hepatic ribosomes and their subunits".

J. Mol. Biol. 11, 174-186.

Taylor, M.M. , Glasgow, J.E. , und Storck, R. , 1967:

"Sedimentation coefficients of RNA from 70 s and 80 s ribosomes".

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 164-169.

Taylor, M.M. , und Storck, R. , 1964:

"Uniqueness of bacterial ribosomes".

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 958-965.

Teodoresco, E. C. , 1905:

"Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblépharidée".

Bot. Zentralblatt, Beihefte 18, 215-232.

Teodoresco, E. C. , 1906 a:

"Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella* .
Rev. Gén. de Botanique XVIII, 353-371.

Teodoresco, E. C. , 1906 b:

"Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella*
(Fin)".

Rev. Gén. de Botanique XVIII, 409-428.

Terao, K. , und Ogata, K. , 1970:

"Preparation and some properties of active subunits from rat liver
ribosomes".

Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 80-85.

Thiers, R. E. , und Vallee, B. L. , 1957:

"Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver".

J. Biol. Chem. 226, 911-920.

Tissières, A. , Schlessinger, D. , und Gros, F. , 1960:

"Amino acid incorporation into proteins by *Escherichia coli* ribosomes".

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 46, 1450-1463.

Tissières, A. , Watson, J. D. , Schlessinger, D. , und Hollingworth, B. R. .
1959:

"Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*".

J. Mol. Biol. 1, 221-233.

Traub, P. , 1970:

"Structure, function and in vitro reconstitution of *Escherichia coli*
ribosomes".

Current Topics in Microbiology and Immunology 52, 1 -93.

Ts'o, P.O.P., Bonner, J., und Vinograd, J., 1956:

"Microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings".

J. Biophys. and Biochem. Cytol. 2, 451-465.

Ts'o, P.O.P., Bonner, J., und Vinograd, J., 1958:

"Structure and properties of microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings".

Biochim. Biophys. Acta 30, 570-582.

Watson, J.D., 1963:

"Involvement of RNA in the synthesis of proteins".

Science 140, 17-26.

Werz, G., und Kellner, G., 1970:

"Die Struktur des Golgi-Apparates bei gefrier-geätzten Dunaliella-Zellen".

Protoplasma 69, 351-364.

Zylber, E.A., und Penman, S., 1970:

"The effect of high ionic strength on monomers, polyribosomes, and puromycin-treated polyribosomes".

Biochim. Biophys. Acta 204, 221-229.

Lebenslauf

Ich wurde am 29. 5. 1940 als Sohn des Arztes Dr. med. Walther Rahmsdorf und seiner Ehefrau Dr. phil. Edith Rahmsdorf, geborene Kuckuck, in Berlin geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Grundschule in Berlin und wechselte dann in das Französische Gymnasium, wo ich 1959 das Abitur ablegte.

Zum Sommersemester 1959 wurde ich an der Freien Universität in Berlin immatrikuliert. Ich studierte im Hauptfach Biologie, unter besonderer Berücksichtigung der Botanik, und in den Nebenfächern Chemie und Physik. Nachdem ich im Sommer 1962 das Vordiplom bestanden hatte, konzentrierte ich mein Interesse auf das Gebiet der Pflanzenphysiologie. In den Jahren 1964 - 1966 fertigte ich im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität in Berlin unter Anleitung von Herrn Professor Reinert meine Diplomarbeit an und legte 1967 die Diplomprüfung ab. Danach ging ich an das Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Wilhelmshaven, wo ich die vorliegende Arbeit durchführte.

